

**Biochemische und molekularbiologische
Untersuchungen zur Struktur und Funktion
des Nukleoid-assoziierten DNA-Bindeprotein H-NS
aus *Escherichia coli***

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem Fachbereich für Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Birgitta Ziegler
aus Mainz

Marburg/Lahn, 2000

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von November 1996 bis August 1999 am Fachbereich Biologie im Laboratorium für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. E. Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. R. Thauer

Tag der mündliche Prüfung: 06.10.2000

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	1
II	Einleitung	2
1	Die Organisationsstruktur des Genoms von <i>E. coli</i>	2
1.1	Dynamische Organisation des Genoms	3
1.2	Topologische Domänen als übergeordnete Verpackungseinheiten	3
1.3	Kleine Packungseinheiten oder Kurz-Distanz-Packung	4
1.3.1	Freie Superspiralisierung (Supercoiling)	4
1.3.2	Beschränkung der Superspiralisierung durch Nukleoid-assoziierte Proteine	5
1.4	Makromolekulares Crowding	5
2	Nukleoid strukturierende Proteine	6
2.1	HU	7
2.2	IHF	8
2.3	Fis	10
2.4	Lrp	11
2.5	Dps	12
2.6	Transkriptionsregulation durch DNA-Bindeproteine	12
3	H-NS	13
3.1	Strukturelle Eigenschaften	13
3.2	Interaktion von H-NS mit Nukleinsäuren	15
3.3	Globale Regulation von zellphysiologischen Prozessen	16
3.4	Regulation der <i>hns</i> Expression	21
3.5	Das H-NS-Paralog StpA	22
4	Zielsetzung der Arbeit	23
III	Material und Methoden	24
1	Chemikalien und Materialien	24
2	Bakterienstämme und Plasmide	24
3	Medien und Zusätze	27
3.1	Vollmedien und Minimalmedien	27
3.2	Indikatormedien	27
3.3	Zusätze und Antibiotika	28
4	Mikrobiologische Methoden	28
4.1	Wachstumsbedingungen	28
4.2	Zelldichtebestimmung	29
4.3	Konfokale Mikroskopie	29
4.3.1	Herstellung der Zellpräparate	29
4.3.2	Spezifische Färbung von Proteinen	30
4.5.3	Spezifische Färbung von DNA	30

4.3.4	Mikroskopie	30
5	Genetische und molekularbiologische Methoden	31
5.1	Testen von Bakterienstämme auf Mutation im <i>recA</i> -Gen	31
5.2	DNA-Isolation	31
5.3	Klonierungstechniken	31
5.4	Gelelektrophorese	32
5.5	Transformation von <i>E. coli</i>	32
5.6	P1 <i>vir</i> -vermittelte Transduktion	32
5.7	Plasmidkonstruktionen	33
5.8	Konstruktion von <i>E. coli</i> -Stammes BZ 56 mit dem Integrations-plasmids pKO3Stämmen	35
5.9	Amplifikation von DNA-Fragmenten	35
5.10	Sequenzierung von DNA	36
5.11	Computergestützte DNA-Analyse	36
5.12	DNA-Retardationsexperiment	36
6	Biochemische Methoden	37
6.1	Proteinbestimmung	37
6.2	Ganzzellextrakte	37
6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
6.4	Zweidimensionale Polyacrylamidelektrophorese	38
6.4.1	Probenvorbereitung	38
6.4.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF)- die erste Dimension	38
6.4.3	SDS-PAGE- die zweite Dimension	39
6.5	β-Galaktosidase-Enzymtest	39
6.6	Überproduktion von H-NS und H-NS224 mit dem T7Φ10-Promotor/ T7-RNA-Polymerase-System	40
6.7	Reinigung von H-NS und H-NS*	40
6.7.1	Reinigung von H-NS	40
6.7.2	Reinigung von H-NS224	41
6.7.3	Reinigung von H-NS-208, H-NS210, H-NS229 und H-NS230	41
6.8	Reinigung von StpA	41
6.9	Immunologischer Nachweis von H-NS und H-NS-Derivaten	42
IV	Ergebnisse	44
1	Einfluß von <i>hns</i> auf verschiedene physiologische Funktionen	44
1.1	Einfluß auf die Expression von <i>proU</i> und <i>bgl</i>	44
1.2	Einfluß auf die Transposition von Tn10	48
1.3	Einfluß auf die Expression von <i>frd</i>	50
2	Einfluß von <i>hns</i> auf das Proteinmuster der Zelle	53
2.1	Übersicht der verschiedenen Effekte von <i>hns206::bla</i>	53
2.2	Einfluß verschiedener Punktmutanten auf das Proteinmuster von <i>E. coli</i>	55

3	Untersuchungen zum DNA-Bindeverhalten	59
3.1	Indirekter Nachweis des DNA-Bindeverhaltens	59
3.1.1	Konstruktion der pBAD-Derivate	60
3.1.2	Komplementation der <i>hns206::bla</i> Mutation	60
3.2	Direkter Nachweis des Bindeverhaltens	65
3.2.1	Überexpression der Punktmutanten	65
3.2.2	Reinigung der Proteine H-NS und H-NS224	66
3.2.3	Reinigung der Proteine H-NS210 und H-NS229	67
3.2.4	DNA-Bandshifts mit H-NS und H-NS224	69
3.2.5	DNA-Bandshifts mit dem H-NS-Paralog StpA	72
3.3	Autoregulationsverhalten verschiedener <i>hns</i> -Punktmutanten	77
4	Darstellung der DNA-Bindeverhaltens	78
4.1	Mikroskopische Darstellung der Nukleoidkondensation	78
4.2	Vergleich der Verhältnisse von Zell- und Nukleoiddurchmesser von <i>hns</i> -Stämmen mit Stämmen verschiedener <i>hns</i> -Derivate	79
5	Phylogenetischer Vergleich verschiedener H-NS-Proteine	85
V	Diskussion	88
1	Regulation verschiedener zellphysiologischer Vorgänge durch H-NS	88
2	Struktur von H-NS	90
3	Struktur-Funktionsbeziehung	92
3.1	Die verschiedenen <i>hns</i> -Punktmutanten	92
3.2	DNA-Bindefähigkeit von H-NS	93
3.3	Oligomerisierung	95
3.4	Negative Dominanz der Punktmutanten und der C-terminal verkürzten H-NS-Fragmente	96
3.5	Verschiedene Modelle zur Aufteilung von H-NS in funktionelle Domänen	98
4	Funktionsweise von H-NS	100
4.1	Regulation durch H-NS auf Transkriptionsebene	100
4.2	Einfluß auf die Stabilität des Chromosoms	102
5	H-NS als übergeordneter Modulator in einem Regulationsnetzwerk	103
5.1	Regulation der Menge an H-NS	104
5.2	H-NS reguliert durch die Bildung von Homo- und Heteromere	105
5.3	H-NS agiert im Zusammenspiel mit verschiedenen Effektoren	106
VI	Ausblick	109
VII	Literatur	110

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Modell der C-terminale Domäne von H-NS	17
Abb. 2:	Konstruktion der Plasmide pBZ1, pBZ2 und pBZ15	34
Abb. 3:	Übersicht der <i>hns</i> -Punktmutanten	43
Abb. 4:	Allelspezifischer Phänotyp der auf dem Chromosom lokalisierten Punktmutanten	46
Abb. 5:	Negative Dominanz der auf dem Plasmid pALP1 lokalisierten <i>hns</i> -Punktmutation <i>hns224</i>	48
Abb. 6:	Einfluß von <i>hns205</i> auf die Expression der <i>frdA-lacZ</i> Fusion in Abwesenheit von Sauerstoff	51
Abb. 7:	Einfluß von <i>hns205</i> auf die Expression von <i>frdA-lacZ</i> Fusion bei Wachstum mit den Substraten Glucose, Fumarat und Succinat unter Anwesenheit von Sauerstoff	52
Abb. 8:	Vergleich des Proteinmusters von MC4100 (<i>hns</i> ⁺) und PD32 (<i>hns206</i>)	54
Abb. 9:	Vergleich des Proteinmusters von MC4100 (<i>hns</i> ⁺) und PD32 (<i>hns206</i>) mit den Mustern zweier exemplarisch ausgewählten <i>hns</i> -Punktmutanten	55
Abb. 10:	Vergleich des Proteinmusters von MC4100 (<i>hns</i> ⁺) und PD32 (<i>hns206</i>) mit den Mustern von Wildtyp und <i>hns206</i> -Mutante in denen das auf einem Überexpressionsplasmid lokalisierte <i>hns224</i> überproduziert wurde	57
Abb. 11:	Konstruktion der pBAD-Derivate	58
Abb. 12:	Komplementation von <i>hns206::bla</i> durch <i>hns</i> lokalisiert auf pBAD33	60
Abb. 13:	Komplementation der <i>hns206::bla</i> -Mutation durch verschiedene <i>hns</i> -Derivate	61
Abb. 14:	<i>hns</i> -Punktmutanten zeigen einen dominant-negativen Phänotyp	61
Abb. 15:	Fähigkeit der <i>hns</i> -Punktmutanten die Expression der <i>proU-lacZ</i> Fusion zu vermitteln	62
Abb. 16:	Western Blot zur Darstellung der Abhängigkeit der H-NS-Menge von der Arabinose-Konzentration	64
Abb. 17:	Western Blot aus Ganzzellextrakten nach Überproduktion von H-NS und H-NS* im IPTG-induzierbaren T7-RNA-Polymerase-Expressionssystem	66
Abb. 18:	Proteinreinigung von H-NS und H-NS224	67
Abb. 19:	Proteinreinigung von H-NS210 aus JML10	68
Abb. 20:	Proteinreinigung von H-NS229 aus ALP3	69
Abb. 21:	Interaktion von gereinigtem H-NS bzw. H-NS224 mit dem Promotorfragment von <i>proU</i>	71
Abb. 22:	Interaktion von gereinigtem H-NS bzw. StpA mit dem Promotorfragment von <i>hns</i>	74
Abb. 23:	Interaktion von gereinigtem H-NS bzw. StpA mit dem Promotorfragment von <i>stpA</i>	75
Abb. 24:	Interaktion von gereinigtem H-NS bzw. StpA mit dem Promotorfragment von <i>proU</i>	76
Abb. 25:	Vergleich der H-NS-Menge von MC4100 und JML10	77
Abb. 26:	C-terminal verkürzte H-NS-Derivate	80
Abb. 27:	Kontrolle der Überproduktion	80
Abb. 28:	Nukleoidkondensation in GF3 mit dem H-NS Wildtypprotein (pPD3)	82
Abb. 29:	Darstellung der Kontrollen: GF3 (pPD100) induziert (rechts) und GF3 (pJB010) induziert (links)	82
Abb. 30:	Veränderte Morphologie der <i>hns224</i> -Mutante (pALP1)	82
Abb. 31:	Nukleoidkondensation durch das kürzeste C-terminale Fragment <i>hns214</i> (pPD106)	83
Abb. 32:	Nukleoidkondensation durch das C-terminale Fragment <i>hns222</i> (pPD102)	83

Abb. 33:	Nukleoidkondensation durch die Punktmutation <i>hns233</i> (pBZ13)	83
Abb. 34:	Phylogenetischer Vergleich der Aminosäuresequenz von H-NS-Proteinen verschiedener Mikroorganismen	86
Abb.35:	Amphipathische Helix	90
Abb. 36:	C-terminale Domäne von H-NS (Aminosäure 91-137)	91
Abb. 37:	Übersicht über die bisher bekannten funktionelle Domänen von H-NS und die ihnen zugeordnete Funktion	99
Abb. 38:	Modell der verschiedenen Interaktionen mit anderen Regulatoren	107

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Einfluß von H-NS auf Transkriptionsebene	17
Tab. 2:	Effekte von <i>hns</i> -Mutationen	21
Tab. 3:	Verwendete Bakterientämme von <i>E. coli</i>	24
Tab. 4:	Plasmide	25
Tab. 5:	Verwendete Oligonukleotide	36
Tab. 6:	Die in dieser Arbeit verwendeten <i>hns</i> -Punktmutanten	47
Tab. 7:	Einfluß der chromosomalen Punktmutanten auf die Expression von <i>bgl</i>	47
Tab. 8:	Einfluß von <i>recA</i> und verschiedenener <i>hns</i> -Punktmutanten (<i>hns210</i> , <i>hns229</i> und <i>hns230</i>) auf die Excisionsrate von <i>Tn10</i>	49
Tab. 9:	Lokalisation der <i>hns</i> -Punktmutationen in den verschiedenen pBAD-Derivaten	59
Tab. 10:	Verhältnis von Zell- zu Nukleoidgröße von <i>hns</i> und verschiedenen Mutanten	81

Abkürzungen

Amp	Ampicillin (Amp ^r : resistent gegen Ampicillin)
bgl ^{+/-}	β-Glucosidverwertung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cml	Chloramphenicol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Disodium-Ethylenamin-Tetraessigsäure
H-NS/ H-NS*	Bezeichnung für das Wildtypprotein bzw. für die Proteine der Punktmutanten (entsprechend für die Gene <i>hns/hns*</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
NaCit	Natriumcitrat
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
ONPG	Ortho-nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spc	Spectinomycin
Strep	Streptomycin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

I. Zusammenfassung

Im Rahmen meiner Doktorarbeit beschäftigte ich mich mit dem Nukleoid-assoziierten DNA-Bindeprotein H-NS aus *Escherichia coli*. Das Protein erfüllt in der Zelle zusammen mit anderen Nukleoid-assoziierten Proteinen einerseits die Funktion des Genomorganisators und andererseits moduliert H-NS die Transkription von mehr als 40 Genen, wobei es meist als Repressor wirkt (Atlung & Ingmer, 1997). Der Fokus der Arbeit lag darauf zu untersuchen, was die strukturelle Basis für die Wirkungsweise des Proteins ist. Mit Hilfe von Punktmutanten, die überwiegend im C-terminalen Abschnitt des Proteins lokalisiert sind, konnte gezeigt werden, daß die Mutanten bei der Expression der *proU-lacZ* Fusion und des *bgl*-Gens Allelspezifizität zeigen. Die Allelspezifizität ließ sich auch durch Protein-2-D-Gele zeigen, wenn auch die Effekte auf das Proteinmuster der jeweiligen Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp-Stamm nicht drastisch waren. Daß das vom Wildtyp abweichende Regulationsverhalten der Mutanten durch die Veränderung der DNA-Bindefähigkeit verursacht wird, zeigten Retardierungsexperimente mit gereinigtem Wildtyp und mutierten H-NS-Proteinen. Die Aussage wird bekräftigt durch Komplementationsexperimente in einem Überexpressionssystem, das es ermöglichte durch die Variation der Induktormenge, die Menge an produziertem H-NS zu steuern. Die vollständige Repression der Expression von *proU-lacZ* wurde in diesem System bei gleicher Proteinmenge in der Zelle nur durch das Wildtypprotein erreicht. Für die Repression ist sowohl der C-terminale als auch der N-terminale Abschnitt entscheidend, Punktmutationen in beiden Bereichen führten zur Depression. Durch die eingeschränkte DNA-Bindefähigkeit sind diese Mutanten nicht mehr zur negativen Autoregulation des *hns*-Strukturgens in der Lage. Die H-NS-Menge mutierter H-NS-Derivate steigt im Vergleich zur Gesamtmenge an Protein in der Zelle.

Bei Überproduktion von plasmidkodierten H-NS mittels des T7-RNA-Polymerase-Systems in Zellen, die chromosomal das Allel *hns206* tragen, kann man eine starke Kondensation des Nukleoids beobachten. Die Kondensation ist deutlich schwächer, wenn die Punktmutation in H-NS in dem C-terminalen Abschnitt des Proteins lokalisiert ist. Der Verlust der über diesen Abschnitt im H-NS-Protein vermittelten DNA-Bindefähigkeit scheint deutliche Auswirkungen auf die Struktur des Nukleoids zu haben. Die Mutante *hns224*, die eine Punktmutation im vorderen Drittel des H-NS-Proteins kodiert, bildet filamentartig gestreckte Zellen, die sich nach der Zellteilung nicht trennen, was möglicherweise auf einen Defekt in der Zellteilung hindeutet.

H-NS läßt sich in funktionelle Domänen einteilen (Williams *et al.*, 1996; Ueguchi *et al.*, 1996), bei dem der N-terminale Bereich die Protein-Protein-Interaktion für die Dimerisierung leistet und der C-terminale Bereich ab Aminosäure 64 für die DNA-Bindung notwendig ist. Eine dritte Domäne für die Repression läßt sich für bestimmte von H-NS regulierte Promotoren ableiten.

H-NS als zentrales Protein eines regulatorischen Netzwerks besitzt ein molekulares „Backup“, das zu 58 % homologe Protein StpA, das jedoch im Vergleich zu H-NS in geringerer Menge in der Zelle vorliegt. Beide Proteine reprimieren gegenseitig ihre Biosynthese (Zhang *et al.*, 1996). Die DNA-Bindefähigkeit von StpA im Promotorbereich von *hns* ist verglichen mit H-NS verminderte.

II Einleitung

Escherichia coli ist ein gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium und gehört in die Familie der *Enterobacteriaceae*. Es wird in die γ -Gruppe der Proteobakterien eingegliedert, die größte und physiologisch divergenteste Gruppe. *E. coli* ist als fakulativ aerober Mikroorganismus somit an die Lebensweise sowohl im Darm von Mensch und Säugetieren als auch in der Umwelt angepaßt. Im Darm findet *E. coli* einerseits ein hohes Nahrungsangebot bei optimaler Wachstumstemperatur von 37°C vor, muß sich jedoch in der Darmmikroflora gegen Konkurrenten wie *Bacteroides* und *Bifidobacterium* behaupten und sich den Abwehrmechanismen des Wirts widersetzen. Sind die Abwehrmechanismen des Wirtes aufgrund von Disposition oder Immunschwäche nicht effizient genug, können Enterotoxin produzierende *E. coli*-Stämme auch als fakultativ pathogene Mikroorganismen Infektionen von Gallenwegen und Harnwegen hervorrufen. Auch Diarrhöe und Ruhr ähnliche Krankheiten können von *E. coli* verursacht werden.

Nach der Darmpassage wird *E. coli* ausgeschieden und gelangt in den Boden, Süßgewässer oder das Meer. In dieser neuen Umgebung, in der *E. coli* meist Mangelbedingungen ausgesetzt ist und sich im ständigen Hungerzustand befindet, wird es zusätzlich mit wechselnden äußeren Veränderungen wie Temperaturschwankungen, Änderungen im Sauerstoffgehalt und der Osmolarität konfrontiert. An die verschiedenen Umweltstresssituationen und an das veränderte Nahrungsangebot bei dem Wechsel vom Wirt in die Umwelt kann sich *E. coli* durch verschiedene Strategien anpassen. Sie ermöglichen es *E. coli*, seine Lebensfunktionen sowie die Zellintegrität, den Stoffwechsel und die Vermehrung aufrecht zu erhalten.

Um die diversen Anpassungen durchzuführen, braucht *E. coli* Regulationsmechanismen, die es dem Bakterium ermöglichen, auf exogene Bedingungen schnell und adäquat zu reagieren. Geleistet wird dies durch ein dynamisch organisiertes Genom, wodurch die jeweils benötigten Gene für die Expression zugänglich gemacht werden.

1 Die Organisationsstruktur des Genoms von *E. coli*

Das *E. coli* Genom besteht wie alle bakteriellen Genome aus einem ringförmig geschlossenen, doppelsträngigen DNA-Molekül. Mit einer Länge von 1,1-1,4 mm und $4,6 \cdot 10^6$ bp umfaßt es mehr als 1400 Gene. Betrachtet man eine *E. coli* Zelle der durchschnittlichen Größe von $0,75 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ wird deutlich, daß die Länge des DNA-Moleküls 700-fach größer als die Bakterienzelle ist, das Molekül also deutlich komprimiert in der Zelle vorliegen muß. Die DNA-Konzentration in der Zelle ist daher sehr hoch und die durchschnittliche Packungsdichte beträgt zwischen 20 und 50 mg/ml (Kellenberger, 1990). Erst elektronenmikroskopische Aufnahmen mit schnell tief gefrorenen kryosubstituierten Zellen konnten zeigen, daß die bakterielle DNA nicht diffus innerhalb der gesamten Zelle verteilt ist, sondern daß die chromosomale DNA in einer deutlich vom Cytoplasma abgetrennten, ribosomenfreien Zone zentriert ist (Kellenberger, 1991; Robinow &

Kellenberger, 1994). Die bakterielle DNA ist im Gegensatz zu Eukaryonten nicht von einer Membran umgeben und wird daher als Nukleoid („kernähnlich“) bezeichnet (Drlica & Riley, 1990; Robinow & Kellenberger, 1994; Pettijohn, 1996).

1.1 Dynamische Organisation des Genoms

Die Unterschiede in der Organisation des Genoms bei Eukaryonten und Prokaryonten zeigen sich auch in der Form, wie die Kompaktierung stattfindet. Bei Eukaryonten findet man das relativ rigide strukturierte Chromatin vor, was in dieser Form in Bakterienzellen nicht gefunden wurde. Vielmehr liegt das gesamte Chromosom in einem dynamischen Zustand vor, in dem es jederzeit Vorgängen wie Replikation, Transkription, Transposition und Rekombination zugänglich ist (Bohrmann *et al.*, 1991; Robinow & Kellenberger, 1994). Unter optimalen physiologischen Bedingungen findet alle 20 min Zellteilung statt, so daß meist zwei und mehr Nukleoide in der Zelle vorliegen.

In dem Genom von Bakterien liegen im Vergleich zu Eukaryonten nicht so viele repetitive Sequenzen vor. Während im eukaryontischen Genom nur 10 % der DNA kodieren, sind im bakteriellen Genoms nahezu alle DNA-Bereiche kodierend oder regulierend. Inaktive Gene werden im Innern des Nukleoids gelagert und werden erst bei Bedarf an die Oberfläche des Nukleoids gebracht, wo Enzyme des Replikations-, Transkriptions-, Transpositions oder Rekombinationsapparates angreifen können. Man stellt sich vor, daß das Nukleoid in ständiger Bewegung gehalten wird (Miller *et al.*, 1970; Kellenberger, 1990; Kellenberger, 1991; Robinow & Kellenberger, 1994). An der Oberfläche des Nukleoids findet auch die an die Transkription gekoppelte Translation statt. Die flexible Organisation ist außerdem eine Vorbedingung für ein schnelles Reagieren auf sich ändernde Lebenssituationen, in denen meist komplett andere Gensets verschiedener Genomregionen angeschaltet werden müssen. Das Nukleoid verändert dabei seine Form in Abhängigkeit von der physiologischen Situation und kann weit mehr als 1/3 des Zellvolumens ausfüllen.

1.2 Topologische Domänen als übergeordnete Verpackungseinheiten

Führt man in die DNA gezielt einen Einzelstrangbruch, der es der DNA erlaubt sich zu entspannen, ein, so findet man, daß sich nicht die gesamte, genomische DNA entspannt, sondern nur diejenige innerhalb einer definierten Schleife, einer sogenannten „Topodomäne“ (Worcel & Burgi, 1972). Insgesamt unterteilt sich die genomische DNA in etwa 50 Schleifen, deren Ausdehnung in *E. coli* durchschnittlich 100 kb beträgt. Die Schleifen werden als Region definiert, die der gleichen topologischen Beschränkung unterliegen und somit eine unabhängige topologische Einheit bilden. Innerhalb einer Domäne sind daher die beiden Parameter Windungszahl (Linking number) und Anzahl der Windungen der Superhelix (Writh) gleich. Die Anzahl der Windungen gilt als ein Maß für die Superspiralisierung. Gleiche Domänengrößen fand man in anderen Bakterien, in Prokaryonten und auch in eukaryontischem Chromatin. Die Organisation in

solchen „Supercoiling Domänen“ hat den Vorteil, daß alle Veränderungen des superhelikalen Zustands, die sich durch Reparaturvorgänge, Replikation und Rekombination ergeben, sich nur in der Domäne auswirken, in der das Ereignis stattgefunden hat. Der Rest des Genoms bleibt unbeeinflusst und erfordert keine nachträgliche Bearbeitung durch Topoisomerasen.

Die Domänenstruktur in 50 Schleifen kompaktiert das zirkulär geschlossene, ungefaltete Genom von 430 µm Durchmesser auf ein Molekül mit einem Durchmesser von 17 µm (Pettijohn, 1996), die DNA-Doppelhelix wird um den Faktor 25 kompakter. In Beziehung zu der topologischen Definition der Domänenstruktur wird die Verankerung der chromosomalen DNA an die Cytoplasmamembran durch Membranproteine gebracht (Odgen *et al.*, 1988; Imamura *et al.*, 1992), zumal Membranproteine in Nukleoidpräparationen gefunden wurden (Odgen & Schaechter, 1986). Als Verankerungspunkt dient der *oriC*, wenn die DNA semimethyliert vorliegt und eine weitere Initiation der Replikation nicht direkt bevor steht (Odgen *et al.*, 1988; Kataoka *et al.*, 1991; Schmid & von Freiesleben, 1996), oder andere der Membran aufliegende Strukturen. Die strukturelle Basis für die Definition der chromosomalen Domänen könnte in Analogie zu eukaryontischen Chromosomen (Mirkovitch *et al.*, 1988) die DNA Gyrase sein (Drlica, 1987), die sogenannte REP- oder PU-Sequenzen erkennt (Gilson *et al.*, 1984; Stern *et al.*, 1987) und spezifisch bindet. Sie kann dort getrennte Orte unter Schleifenbildung zusammen bringen. Mit etwa 300-500 Kopien machen die in der Gruppe der *Enterobacteriaceae* hochkonservierten REP-Sequenzen 0,5 % des *E. coli* Genoms aus. Die 35 bp langen, extragenischen palindromischen REP-Sequenzen sind meist in Elementen aus mehreren REP-Sequenzen angeordnet und ihre Abstände zueinander entsprechen einer Superspiralisierungsdomäne.

1.3 Kleine Packungseinheiten oder Kurz-Distanz-Packung

1.3.1 Freie Superspiralisierung (Supercoiling)

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, daß die DNA in superspiralisierten (supercoiled) Schleifen organisiert ist. Studien, bei denen Ethidiumbromid in die DNA interkalierte, erbrachten, daß die DNA des Chromosoms negativ superspiralisiert ist und somit eine der linearen DNA energetisch überlegene Struktur als lineare DNA einnimmt. Für die Zelle besteht auch deswegen ein Interesse, den energetisch günstigen Zustand von negativer Superspiralisierung (Supercoiling) zu erhalten, weil negativ superspiralisierte DNA das Aufschmelzen des Doppelstranges erleichtert und somit Energie bei Transkription und Replikation eingespart werden können. Außer den lokalen Änderungen der Superspiralität, die bei Rekombination, Replikation und Transkription („Twin-Modell“) (Spirito *et al.*, 1994) auftreten, können Umwelteinflüsse wie Sauerstoff-, Nahrungsangebot, Temperatur, Osmolarität und Wachstumsphase global auf die Superspiralität der DNA einwirken. Dabei können sie die Superspiralität sowohl in Richtung positiver als auch negativer Superspiralität verändern. Weiter wirkt die Superspiralität regulierend auf die Expression umweltskontrollierter Gene ein, einerseits kann der Abstand zur –10 und –35-Region verändert werden, wodurch die –10 und –35-Region in eine topologisch günstigere Lage gebracht wird, die dann von der RNA-Polymerase effizienter gebunden werden

kann. Andererseits kann durch die Änderung der Superspiralität der gegenteilige Effekt erreicht werden, daß der Promotor nicht mehr effizient abgelesen werden kann (Higgins *et al.*, 1990; Dorman & NiBhriain, 1992; Dorman & NiBhriain, 1993).

Die Funktion des Supercoilings besteht zum einen darin die DNA dichter zu packen, und zum anderen steht es im Gleichgewicht mit der Torsionsspannung der Doppelhelix und beeinflusst die Interaktion der DNA mit Proteinen.

1.3.2 Beschränkung der Superspiralisierung durch Nukleoid-assoziierte Proteine

Die DNA weist eine niedrigere superhelicale Dichte als berechnet auf (Drlica, 1987; Pettijohn, 1996). Verursacht das wird durch die Bindung Nukleoid-assoziiierter Proteine, die lokal den Grad der effektiven Superspiralisierung verändern. Mengenmäßig dominieren die Proteine HU, IHF und H-NS. Sie sind in der Lage DNA zu biegen oder aufzuwickeln und binden präferenziell und mit höherer Affinität gebogene DNA. Sie verdrehen DNA und erhöhen die Flexibilität in kurzen DNA-Abschnitten. Es wird angenommen, daß ohne die DNA-Bindeproteine die superhelikale Dichte nur halb so groß wäre (Pettijohn & Pfenninger, 1980; Bliska & Cozzarelli, 1987). Aufgrund ihrer großen Menge in der Zelle können sie in regelmäßigen Abständen an DNA binden, HU beispielsweise könnte alle 300-400 bp binden. Für HU wurde ein Modell von Broyles und Pettijohn (1986) entwickelt, in dem die Autoren zwei Dinge beobachteten: eine veränderte Ganghöhe der Doppelhelix und in regelmäßigem Abständen eine Nukleasesensitivität. Beides fügte sich zu einem Modell, das beschreibt, wie HU-Tetramere von DNA umwickelt werden und in den ungeschützten Bereichen Nuklease Linker-DNA schneiden kann.

Der Zustand der Superhelikalität wird in ringförmig geschlossenen DNA-Molekülen von antagonistisch wirkenden Topoisomerasen aufrechterhalten. Die Topoisomerase I (TopA) entspannt ausschließlich negativ superspiralisierte, doppelsträngige DNA (Wang, 1985). Die DNA-Gyrase, eine Topoisomerase der Klasse II, führt negative Superspiralisierung unter Verbrauch von ATP in die DNA ein und reduziert so die Linking number (Corazelli, 1980; Gellert, 1981). Weiter sind die Topoisomerasen III und IV bekannt, sie sind jedoch nicht an dem Erhalt dieses homöostatischen Gleichgewichtes beteiligt (DiGate & Marians, 1989; Adams *et al.*, 1992). Die RNA-Polymerase (RNAP) trägt durch ihre Tätigkeit zusätzlich zur Veränderung der Superhelikalität bei (Liu & Wang, 1987), die DNA ist vor dem Enzym positiv und hinter ihm negativ superspiralisiert, durch entsprechende Aktivität der Topoisomerasen wird der ursprüngliche Zustand wiederhergestellt.

1.4 Makromolekulares Crowding

Einen weiteren Beitrag zur Verdichtung der bakteriellen DNA leisten lösliche Makromoleküle, meist Proteine aber auch andere Polymere, die in hoher Konzentration im Cytoplasma vorhanden sind (Zimmerman, 1993; Murphy & Zimmermann, 1994; Zimmerman & Murphy, 1996). Durch das makromolekulare Crowding werden bereits kompakte Regionen des Nukleoids stabilisiert.

Die strukturellen Veränderungen resultieren zum einen in einer Reduktion der Abstosungsreaktionen innerhalb des DNA-Moleküls, die dazu führt, daß die DNA stärker kondensiert wird. Die positiv geladenen Moleküle wie Polyamine, Spermidin und Putrescin und auch Mg^{2+} können als Gegenionen der Phosphatgruppen der DNA dienen, sie neutralisieren und so die Ladungen innerhalb der DNA vermindern. Die DNA kann stärker aggregieren und zeigt die sogenannte psi-Struktur (Zimmerman, 1993). Zum anderen wird die Bindung zwischen DNA und DNA-Bindeproteinen, die den Zustand der Superspiralisierung oder Kondensierung fördern, begünstigt. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, sind nicht alle der bekannten Nukleoid-assoziierten Proteine in gleicherweise notwendig für die durch Crowding hervorgerufene Kondensation. Löst man HU aus dem unter Nukleoid unter Bedingungen, die das „Crowding“ stabilisieren, ändert sich der Grad der Kondensation nicht (Murphy & Zimmerman, 1997).

2. Nukleoid strukturierende Proteine

Wie oben bereits erwähnt, sind an der Kondensierung der DNA kleine, basische oder neutrale Proteine beteiligt, die in ihrer Funktion mit den Nukleosomen vergleichbar sind. Aufgrund dieser Ähnlichkeit wurden sie auch als „histonähnlich“ bezeichnet. Um sie jedoch von den Histonen der Eukaryonten abzugrenzen, werden sie häufig auch als Nukleoid-assoziierte Proteine bezeichnet (Drlica, 1987; Hayat & Mancarella, 1995; Pettijohn, 1996). Ähnlich wie die Histone, die hochkonservierten DNA-Bindeproteine der Eukaryonten, wirken sie maßgeblich an dem Aufbau des bakteriellen Chromatins mit. Das Genom der Eukaryoten zeichnet sich im Gegensatz zu dem von Prokaryonten dadurch aus, daß in hohem Maß sich wiederholende Sequenzen auftreten und nur ein geringer Anteil Protein-kodierend ist. Die meisten DNA-Abschnitte werden daher in Nukleosomen verpackt, die aus einem Kernpartikel (Core) aus einem Histonoktamer aus je zwei Proteinen H2A, H2B, H3 und H4 bestehen, um die in einer $1\frac{3}{4}$ Windung 146 bp DNA gewunden sind (Kornberg & Klug, 1981; Kornberg & Lorch, 1992). Abgeschlossen und stabilisiert wird das Nukleosom durch ein weiteres Histon, das H1 Protein. In Anwesenheit von H1 wird das Nukleosom zum Chromatosom, das über H1 in Interaktion mit anderen Chromatosomen treten kann und die Basis für weitere Packungsstufen ist. Sechs Nukleosomen perlschnurartig verbunden, werden zu Solenoiden zusammengefaßt, eine sehr feste Packung, die im krassen Gegensatz zu dem dynamischen Chromatin von Prokaryonten steht. Bei Bakterien konnte bisher ein solch definierter Packungsmodus nicht gefunden werden, zwar findet man auch hier perlschnurartige Strukturen von DNA und Proteinen, aber keinen Zusammenschluß zu Solenoid ähnlichen, übergeordneten Verpackungen (Drlica, 1987), was sicher auch darin begründet ist, daß fast alle DNA-Bereiche codierende oder regulatorische Funktion haben und der Zugriff rasch möglich sein muß. In das Interesse rückten die Nukleoid-assoziierten Proteine nicht allein aufgrund ihrer Funktion in der Chromosomenorganisation, die in den 70er- und 80er-Jahren intensiv studiert wurde, sondern durch ihre Mitwirkung an globalen Regulationsprozessen in Abhängigkeit von Umweltfaktoren. Die Regulation erfolgt hierbei meist auf transkriptioneller, in wenigen Fällen auch auf translationaler Ebene. Bei den Nukleoid-assoziierten Proteinen handelt es sich jedoch nicht um

typische, sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren, sondern ihre Wirkung wird häufig über Veränderung der DNA-Topologie oder der Chromatinstruktur vermittelt.

Mittlerweile ist es gelungen, eine große Anzahl verschiedener Nukleoid-assoziiierter Proteine zu isolieren und ihre Funktion zu charakterisieren. Die für *E. coli* bekannten Histon ähnliche Proteine HU, IHF, Fis, Lrp und H-NS sollen im folgenden vorgestellt werden.

2.1 HU

Das Nukleoid-assoziierte HU Protein (NS, HD, DBPII) ist ein kleines, basisches Protein, das in *E. coli* als Homo- und Heterodimer HU- α (HU-2) und HU- β (HU-1) vorliegt. Es wird durch die Gene *hupA* und *hupB* kodiert (Kano *et al.*, 1985; Kano *et al.*, 1987). Die Zusammensetzung der Dimere ist wachstumsphasenabhängig, entsprechend von welchem der Promotoren vermehrt Induktion erfolgt. So kann ausschließlich Induktion von P1 des *hupA* Gens bzw. von P1-P3 des *hupB* Gens, aber auch von den Promotoren beider Gene (Claret & Rouviere-Yaniv, 1997). Innerhalb der verschiedenen Bakterienarten sind die Aminosäuresequenzen hochkonserviert. Häufig liegt nur ein Gen vor, so daß HU als Homodimer vorliegt (Drlica, 1987). HU, das immer noch am besten untersuchte Nukleoid-assoziierte Protein, ist weit verbreitet. Außer in Eubakterien, findet man es in verschiedenen Archaea, in Cyanobakterien, in Hefemitochondrien und Chloroplasten (Hayat & Mancarella, 1995). Durch Röntgenstrukturanalyse von kristallisiertem HBs, einem HU analogen Protein aus *Bacillus stearothermophilus*, wurde ein Strukturmodell aufgestellt (Tanaka *et al.*, 1984) und später mit HU- α modifiziert (Shindo *et al.*, 1993). HU bildet zwei zangenförmige Arme aus, mit der sowohl die große als auch die kleine Furche der DNA umfaßt werden können. Die Zangen reichen für die Bindung jedoch nicht aus, wie Untersuchungen mit HU und HU-IHF-Chimären ergaben (Tanaka *et al.*, 1993; Bonnefoy *et al.*, 1994).

Funktionell ähnelt HU den zu den Nicht-Histon Proteinen zählenden HMG-Proteinen (high mobility group), zu denen jedoch keinerlei Sequenzähnlichkeit besteht (Pontiggia *et al.*, 1993; Bianchi, 1994). Mit 60.000 Molekülen pro *E. coli* Zelle gehört es zu den häufigsten in der Zelle vorliegenden Proteinen, das entspricht bei dem typischerweise gleichmäßig verteilten Protein (Shellman & Pettijohn, 1991) einer DNA-Deckung von einem HU Dimer je 200 bp.

HU bindet bevorzugt gebogene, geknickte und superspiralisierte DNA (Shindo *et al.*, 1992; Pontiggia *et al.*, 1993), aber auch RNA, kruziforme und einzelsträngige DNA wird doppelsträngiger vorgezogen (Kleppe & Holck, 1985). Die Bindung erfolgt in den meisten Fällen sequenzunspezifisch. Für superspiralisierte DNA des Phagen Mu wurde jedoch kürzlich ortsspezifische Bindung nachgewiesen (Kobryn *et al.*, 1999). HU schränkt das freie Supercoiling ein (Bonnefoy & Rouvière-Yaniv, 1992) und fördert in Zusammenarbeit mit der Topoisomerase I das negative Supercoiling (Le Hegarat *et al.*, 1993; Bensaid *et al.*, 1996) und erleichtert das Arbeiten der DNA-Gyrase (Malik *et al.*, 1996), in dem HU die Erkennung der REP-Sequenzen unterstützt (Yang & Ames, 1990). HU ist somit indirekt an dem Erhalt des homöostatischen Gleichgewichts des Supercoilings beteiligt. In den letzten Jahren stellt sich für HU heraus, daß nicht die Genomorganisation die Hauptfunktion ist. So verändert sich die Struktur isolierter Nukleotide nicht,

wenn selektiv HU heraus gelöst wird (Murphy & Zimmerman, 1997). HU übernimmt Funktionen bei der Transkriptionsregulation, bei der Initiation der DNA-Replikation am *oriC* (Bramhill & Kornberg, 1988), bei der homologen Rekombination (Dri *et al.*, 1992) und bei der ortspezifischen Hin vermittelten Rekombination bei der Flagellenphasenvariation (Paull *et al.*, 1994), sowie bei Rekombinationsvorgängen der Transposition von *Tn10* (Morisato & Kleckner, 1987) und des Bakteriophagen Mu (Huisman *et al.*, 1989). HU ist außerdem an der Resuperspiralisierung nach Hitzeschock beteiligt, IHF und H-NS können hierbei HU in der Funktion nicht ersetzen (Ogata, 1997), in vielen Fällen jedoch ist ihre Funktion austauschbar. So erleichtert HU die Bindung verschiedener Regulatorproteine, die bei der Transkriptionsaktivierung zusammen wirken, so am *lac* Promotor (Flashner & Gralla, 1988), am *gal* Promotor (Lewis *et al.*, 1999) und am *proU* Promotor (Gowrishankar & Manna, 1996). Bei der Aktivierung der Transkription wirkt HU nicht als typischer Transkriptionsfaktor, sondern als Hilfsprotein, das durch Einführung struktureller Veränderungen die Erkennung der Zielsequenz oder die Interaktion mehrerer Regulatoren ermöglicht. Im Fall des *lac* Promotors ermöglicht HU die kooperative Bindung von CAP und des *lac* Repressors. Je nach Mengenverhältnis der einzelnen, verschiedenen Nukleoid-assoziierten Proteinen wirken sie synergistisch oder antagonistisch. So fördert HU die Bindung von IHF an Stellen, die nicht der IHF-Erkennungssequenz entsprechen. Liegt es gegenüber IHF 8-fach höher konzentriert vor, verformt es die DNA in solcher Weise, daß IHF nicht mehr binden kann (Bonney & Rouvière-Yaniv, 1991). Solche Wechselwirkungen deuten an, daß die Interaktionen der Nukleoid-assoziierten DNA-Bindeproteine untereinander und der DNA sehr dynamisch sind. Sie beeinflussen sich gegenseitig in unterschiedlichem Maß und sind jeweils auch von äußeren Einflüssen abhängig, die auf die Proteinmenge oder die Zusammensetzung wirken. Außerdem verändern sie die DNA-Gestalt und auf die Zugänglichkeit der Bindestellen.

Die Vielzahl an Wechselwirkungen der Nukleoid-assoziierten DNA-Bindeproteine untereinander und mit DNA und die Abhängigkeit der Zusammensetzung und Menge der einzelnen Proteine von äußeren Einflüssen deuten an, welcher Dynamik die Organisation des Genoms unterliegt.

2.2 IHF

Das Protein IHF (Integration Host Factor) wurde erstmals als essentieller Faktor der integrativen Rekombination des Phagen λ entdeckt. Es handelt sich dabei um ein heterodimeres Molekül, das aus den Untereinheiten HimA (IHF- α) und HimD (IHF- β) aufgebaut ist, die nur 25 % Aminosäuresequenzidentität haben. Die Untereinheiten werden durch die Gene *himA* und *hip* (*himD*) kodiert. IHF-ähnliche Proteine sind in mehreren anderen gram-negativen Bakterien zu finden, in denen sie analoges Bindungsverhalten und Funktion zeigen (Krawczyk & Kur, 1998). Große Homologie in der Primärstruktur der Bindedomäne besteht mit dem Transkriptionsfaktor TFIID der Hefe, der ähnliche Zielsequenzen wie IHF erkennt (Werner *et al.*, 1994). In dieser Domäne hat IHF, bei sonst großer struktureller Ähnlichkeit mit HU, jedoch kaum Sequenzidentität. Der ähnliche Bau von IHF und HU eröffnete die Möglichkeit, Strukturmodelle mit Chimären-Molekülen HU/IHF darzustellen. Beiden Molekülen gemeinsam ist, daß sie einen Arm bilden, der mit der

kleinen Furche interagieren kann. Trotz dieser Gemeinsamkeiten unterscheidet sich der Modus, wie die Proteine Krümmungen in die DNA einführen. IHF kann als Dimer aktiv krümmen, HU benötigt dazu die Oligomerisierung mehrerer Dimere (Bonnefoy & Rouvière-Yaniv, 1991). Auch der Nukleoproteinkomplex mit dem gleichen DNA-Abschnitt unterscheidet sich drastisch (Bonnefoy & Rouvière-Yaniv, 1991). Die Aminosäuresequenzhomologie zu HU und die Fähigkeit, den Mangel an funktionsfähigem HU zu kompensieren, legte eine Reihe ähnlicher Funktionen nahe. IHF gehört zu der Familie der Histon ähnlichen Proteine in Bakterien. Genauso wie diese Gruppe von Proteinen wirkt IHF als Hilfsprotein bei verschiedenen Prozessen wie DNA-Replikation des Chromosoms und verschiedener Plasmide (Biek & Cohen, 1992) und ist während der Zellteilung in die korrekte Aufteilung der DNA auf die Tochterzellen involviert (Filutowicz & Inman, 1991). Weitere physiologische Funktionen, die unter Beteiligung von IHF gesteuert werden, sind die ortsspezifische Rekombination, wobei im Fall des Bakteriophagen λ sich unter Beteiligung von IHF eine Nukleosomen ähnliche Struktur, das *att*-Intasom, aus DNA und Phagenproteinen bildet (Pollock & Nash 1983; Robertson & Nash, 1988), die Transposition verschiedener bakterieller Elemente, die Verpackung und Aufteilung von Phagen-DNA (Friedman, 1988) und Transkription (Friedman, 1988; Freundlich *et al.*, 1992; Goosen & van de Putte, 1995). Anders als bei HU ist die Bindung zu DNA sequenzspezifisch, die Konsensussequenz WATCAANNNTTR wird erkannt (Craig & Nash, 1984) und in einem Bereich von 40 bp in der kleinen Furche gebunden (Yang & Nash, 1989). Vielfach liegt die IHF-Erkennungsstelle in der Mitte zweier REP-Sequenzen und bildet das sogenannte REP-Element, die als topologische Grenzen bei der Chromosomorganisation dienen (Boccard & Premtki, 1993; Oppenheim *et al.*, 1993), so daß eine aktive Beteiligung von IHF an der Bestimmung der Topodomänen nicht auszuschließen ist. IHF liegt in einer Menge zwischen 8500 und 1700 Molekülen pro Zelle vor (Ditto *et al.*, 1994), in etwa gleicher Menge wie HU vor (Goosen & van de Putte, 1995) und nimmt in der stationären Phase um das 5-10-fache zu (Ditto *et al.*, 1994). IHF wirkt meist dadurch, daß es wie HU aktiv in DNA Biegungen einführt. Dabei kann es den Grad der Superspiralisierung verändern und zur Kompaktierung beitragen (Schmid, 1990; Sheridan *et al.*, 1998). Die Aktivität von IHF wird aber selbst auch durch Supercoiling verändert. So trägt IHF maßgeblich zum Aufbau des Chromosoms bei (Freundlich *et al.*, 1992), und durch die architektonische Veränderung der DNA beeinflusst IHF auch die Genexpression. Da es bei den meisten IHF Mutanten zu keinem besonders stark ausgeprägten Phänotyp kommt, nahm man für die meisten Gene eine modulierende Funktion von IHF an (Friedman, 1988). Es zeichnete sich jedoch zunehmend eine direkte Beteiligung an der Initiation der Transkription ab, sowohl an σ^{54} - als auch an σ^{70} -abhängigen Promotoren. Für verschiedene Gene konnte eine klassische Beteiligung als Repressor für *ompF* (Ramani *et al.*, 1992), *ompC* (Huang *et al.*, 1990) und *ndh* (Green *et al.*, 1997) bzw. Aktivator für *ilvGMEDA* (Pagel & Hatifield, 1991) und *cysJIIH* (Sirko *et al.*, 1998) gezeigt werden. Weil IHF nicht in Antwort auf Umweltreize reagiert, wird vermutet, daß die physiologische Rolle über andere Regulatoren vermittelt wird (Goosen & van de Putte, 1995). Als ein solches Protein wird H-NS diskutiert, weil es auf Umweltreize wie Osmolarität und Ionenstärke reagiert

und besonders AT-reiche, gebogene Regionen bindet (Goosen & van de Putte, 1995; Rowbury, 1997).

2.3 Fis

Das Fis-Protein (Factor of Inversion Stimulation) wurde durch seine Fähigkeit entdeckt, orts-spezifische DNA-Inversion, die durch die phagenkodierten Invertasen Gin, Hin und Cin katalysiert werden, zu stimulieren (Johnson & Simon, 1985; Kahmann *et al.*, 1985). Weitere Funktionen von Fis sind die Unterstützung der DNA-Replikation vom *oriC* [Filutowicz *et al.*, 1992; Gille *et al.*, 1991], die Stimulation der Excision des Bakteriophagen λ [Thompson *et al.*, 1987], die Modulation des Wachstums des Phagen Mu (Bétemier *et al.*, 1989), die Transposition des Transposons Tn5 und der Insertionssequenz IS50 (Weinreich & Reznikoff, 1992) und die Transkriptionsregulation von mehr als 30 Genen, darunter die transkriptionelle Stimulation der rRNA (Ross *et al.*, 1990; Afflerbach *et al.*, 1999) und tRNA-Synthese (Nilsson *et al.*, 1992), und auch die Repression der eigenen Transkription (Ninnemann *et al.*, 1992). Die meisten Gene werden durch Fis reprimiert (Xu & Johnson, 1995). Fis ist mit 11,2 kDa wie die bereits genannten Nukleoid-assoziierten Proteine sehr klein, es liegt in der Zelle als Homodimer (Finkel & Johnson, 1992) vor, wobei jedes Monomer aus 4 verbundenen α -Helices besteht. Wie Röntgenstrukturanalysen ergaben, bilden die beiden letzten Helices ein Helix-Turn-Helix-Motiv (Yuan *et al.*, 1991; Kostrewa *et al.*, 1991; Kostrewa *et al.*, 1992). Die DNA-Bindung wird durch das C-terminale Helix-Turn-Helix-Motiv, ein typisches Strukturmotiv von Transkriptionsfaktoren, vermittelt, das auch maßgeblich an der DNA-Biegung beteiligt ist. Die letzte Helix weist Homologie zu dem Transkriptionsaktivator NtrC auf, der σ^{54} -Promotoren durch Schleifenbildung reguliert (Klose *et al.*, 1994). Dem sehr flexiblen N-terminalen Teil des Proteins kommen Aufgaben bei der Gin- und Hin-vermittelten Inversion und der Transkriptionsregulation zu (Gosink *et al.*, 1993; Koch *et al.*, 1991), er kann dabei weitere DNA-Kontakte und Proteininteraktionen eingehen, jedoch an der Excision des λ -Phagen ist der Aminoterminus nicht beteiligt (Osuna *et al.*, 1991).

Die zelluläre Konzentration von Fis variiert während des Wachstums (Ball *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1987), wobei sie am größten mit 40.000-50.000 Dimeren pro Zelle nach einer Nährstoffzunahme zu Beginn der exponentiellen Phase ist und bei fortgesetztem, exponentiellen Wachstum drastisch abnimmt, bis in der stationären Phase kaum Fis vorliegt. Die Regulation durch Fis erfolgt Wachstumsphasen abhängig (Appleman *et al.*, 1998). Fis bindet als Dimer an Bindestellen mit der sehr degenerierten Konsensus-Sequenz T/GNNYRNNA/TNNYRNNC/A (Hübner & Arber, 1989). Der Kontakt erfolgt in der großen Furche, die eine natürliche Krümmung aufweist, typischerweise an Enhancerstrukturen, den sogenannten upstream activator sequences (UAS) (Hübner & Arber, 1989). Mit der Bindung kommt es zur Konformationsänderung der DNA (Thompson & Landry, 1988), ein Knick oder eine Kurve wird eingeführt und somit die topologische Voraussetzung für Rekombination und Inversion geschaffen oder die Entwindung der beiden DNA-Stränge erleichtert, in dem die Energie für das Aufschmelzen gesenkt wird. Gerade die wachstumsphasenabhängige Expression von Fis legt nahe, daß Fis

eine wichtige Rolle bei der schnellen Adaptation an wechselnde Umwelteinflüsse zukommt, dabei jedoch die Funktion eines Modulators übernimmt, wozu auch paßt, daß das *fis* Gen nicht essentiell für die Zelle ist (Finkel & Johnson, 1992; Gonzalez-Gil *et al.*, 1996).

2.4 Lrp

Lrp (Leucine-responsive regulatory protein) ist ein kleines, basisches Protein, das aus zwei identischen Untereinheiten von je 18.000 Da aufgebaut ist (Willins *et al.*, 1991; Calvo, 1994). Innerhalb der Bakterien ist Lrp weit verbreitet und hoch konserviert (Calvo & Matthews, 1994).

Das Protein läßt sich in drei Domänen aufgliedern. Ein Helix-Turn-Helix-Motiv am N-terminalen Ende vermittelt die DNA-Bindung, ein typisches Strukturmerkmal vieler DNA-Bindeproteine. Der zentrale Bereich ist an der Transkriptionsregulation beteiligt, und das C-terminale Ende bindet Leucin (Platko *et al.*, 1993). Pro Zelle liegen etwa 3000 Moleküle vor (Willins *et al.*, 1991). Die Expression von *lrp* ist autoreguliert (Wang *et al.*, 1994), die Anzahl der Lrp-Moleküle wird außerdem in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle reguliert, wobei hoch oxidierte Kohlenstoffquellen die Lrp-Menge reduzieren. Zudem wirkt sich die Anwesenheit bestimmter exogener Aminosäuren wie Alanin, Threonin und Methionin auf den Leucin-Pool. Auch eine Änderung der Nährstoffzufuhr von Minimal- zu Vollmedium führt zu einer Reduktion der Menge (Lin *et al.*, 1990), was zeigt, daß bei ausreichendem Angebot an Nährstoffen Lrp von untergeordneter Bedeutung ist. Lrp wird somit nach dem Fest-und-Hungersnot-Prinzip reguliert, es nur dann synthetisiert wird, wenn es die Umwelt fordert (Calvo & Matthews, 1994; Ernstings *et al.*, 1992). Die meisten durch Lrp aktivierten Gene sind für die Biosynthese, die meisten durch Lrp reprimierten Gene an Transport- und anabolischen Vorgängen beteiligt. Durch die relative Konstanz der Menge während eines bestimmten Stoffwechselzustandes kann die Lrp-Menge Bezugsgröße für die Menge anderer Nukleoid strukturierender Proteine sein (D'Ari *et al.*, 1993; Ernsting *et al.*, 1993). Das Lrp-Protein bindet Leucin (Marasco *et al.*, 1994), wobei exogenes Leucin als allosterischer Effektor wirkt und Lrp in zwei verschiedenen allosterischen Konformationen aktiv sein kann (D'Ari *et al.*, 1993, Calvo & Matthews, 1994). Leucin dient für die Zelle als Indikator für eine aktive Proteolyse in der unmittelbaren Umgebung (Newman & Lin, 1995). Lrp integriert sowohl viele Leucin abhängige Effekte auf die Genexpression, als auch die Leucin unabhängigen Prozesse, die mengenmäßig überwiegen (Newman *et al.*, 1992). So wird das Methylierungsmuster (van der Woude *et al.*, 1998) und die Transkription von Genen für adhäsive Strukturen wie verschiedene Fimbrientypen durch Lrp kontrolliert (Braaten *et al.*, 1992; Huisman *et al.*, 1994; Nou *et al.*, 1993; Calvo & Matthews, 1994; van der Woude & Low, 1994), aber auch verschiedene Enzyme des Aminosäurestoffwechsels (Lin *et al.*, 1990; Ernstings *et al.*, 1992). In ersten Untersuchungen stellten sich mehr als 25 Gene unterschiedlichster Funktion als Lrp abhängig exprimiert heraus (Ernsting *et al.*, 1993), heute geht man jedoch davon aus, daß 5-10 % aller *E. coli* Gene direkt oder indirekt von Lrp beeinflußt werden (Tchetina & Newman, 1995). In Anwesenheit von Leucin- wird die aktivierende bzw. reprimierende Wirkung von Lrp meist gedämpft. Die *lrp* Mutante zeigt keinen so kritischen Wachstumsphänotyp wie *hns*, jedoch ist ihr die

metabolische Flexibilität verloren gegangen und ist anfällig gegenüber Sekundärmutationen (Ambartsoumian *et al.*, 1994; Newman & Lin, 1995).

Die hohe Molekülzahl pro Zelle, die die Menge eines Transkriptionsregulators, wie des *lac*-Repressors LacI, weit übersteigt, legt die Beteiligung bei der Organisation der DNA-Struktur nahe (D'Ari *et al.*, 1993). Lrp bindet doppelsträngige DNA, jedoch keine einzelsträngige, auch bevorzugt Lrp AT-reiche gebogene Sequenzabschnitte. Eine relativ degenerierte Konsensus-Sequenz AGAATTTTATTCT (Wang & Calvo, 1993) wurde bestimmt, die meist in der kleinen Furche lokalisiert ist. Wahrscheinlich ist, daß Lrp eher Tertiärstrukturen der DNA erkennt. Periodische Folgen von AT-reichen Sequenzen in der dadurch verengten kleinen Furche fördert das DNA-Biegen (Gazeau *et al.*, 1994). Durch das Einführen von Krümmungen bildet Lrp bei der Regulation der Transkription, ein architektonisches Element, das beim Ausbilden eines Nukleoprotein-Komplexes hilft (Wang & Calvo, 1993), damit andere beteiligte Proteine ihre Aktivität entfalten können (Stauffer & Stauffer, 1999). Daß Lrp an der Bildung großer DNA-Protein-Komplexe beteiligt ist, zeigt sich auch durch die große Ausdehnung der Lrp-Bindestellen, an die Lrp z. T. auch kooperativ bindet. Die Summe verschiedener von Lrp verursachten, lokalen Strukturänderungen der DNA und die sich daraus ergebenden übergeordneten Auswirkungen auf die Konformation des Nukleoids lassen es zu, Lrp als Nukleoidorganisator zu klassifizieren (D'Ari *et al.*, 1993).

2.5 Dps

Das erst 1992 entdeckte Nukleoid assoziierte Bindeprotein Dps (DNA-binding protein from starved cells) wird ausschließlich in der Stationärphase induziert (Almirón *et al.*, 1992) und ist in dieser Phase mit 180.000 Molekülen das häufigste Bindeprotein in der Zelle (Talukder *et al.*, 1999). Der Aktivität von Dps wird zugeschrieben, daß das Nukleoid kompakter und dadurch Streß resistenter macht (Martinez & Kolter, 1997). Aufgrund dieses Expressionsmusters kommt Dps möglicherweise beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase eine wichtige Rolle zu und ist an dem globalen Umschaltprozeß zwischen diesen Wachstumsformen beteiligt (Ishihama, 1997). Durch die Kristallstruktur wurde Dps als eines dem Feritin homologes Protein identifiziert (Ishihama, 1997; Grant *et al.*, 1998). Auch die mit 19 kDa geringe Masse ist das Protein mit anderen Vertreter der Nukleoid-assoziierten Proteine vergleichbar.

2.6 Transkriptionsregulation durch DNA-Bindeproteine

Alle bisher genannten Nukleoid-assoziierten Proteinen teilen eine Reihe von Funktionen wie die Replikation, DNA-Rearrangments, DNA-Reparatur und Transposition, die im wesentlichen die Umordnung von DNA und ihre räumliche Annäherung betreffen. Meist kann dabei die Funktion durch ein verwandtes Protein aufgefangen werden, in manchen Fällen lassen sich die einzelnen Beiträge zu einem physiologischen Effekt nicht deutlich trennen (Adhya *et al.*, 1993). Zunehmend rückt jedoch die direkte oder indirekte Beteiligung an der Regulation der Transkription

ins Zentrum des Interesses, wobei sie meist als „modifier“ der Genexpression gehandelt werden. Gemeinsam ist all diesen Vorgängen, daß dabei immer lokale Entwindung doppelsträngiger DNA einbezogen sind und sich ein Nukleoprotein-Komplex aus verschiedenen Proteinen bildet, um den die DNA gewunden ist. Die Zusammensetzung des Komplexes bestimmt meist auch die Aktivität der einzelnen Nukleoid-assoziierten Proteine. Die vier genannten Proteine haben stimulierenden Effekt auf spezifische DNA-Proteininteraktionen, die zu lokalen Verformungen, aber auch des gesamten Nukleoids führen. Langdistanz-Interaktionen, eine gezielte Annäherung weit auseinander liegender DNA-Bereiche, sind die Folge, was die Möglichkeit, daß bestimmte DNA-Bereiche oder bestimmte Regulatorproteine zusammentreffen und miteinander regieren, erhöht. So werden beispielsweise Transkriptions-faktoren, die an weit entfernte Enhancer-Strukturen gebunden sind, der RNAP bei der Transkription genähert werden. Bei der Transkriptionsiniation spielt gerade auch das DNA-Looping, DNA-Biegung und die Verpackung der DNA in höher geordnete Komplexe eine Rolle. Häufig existiert eine Beziehung zwischen flexibler DNA, AT-reiche Abschnitte, und dem Ort präferenzieller Bindung eines Nukleoid-assoziierten Proteins. Nahm man früher an, daß die Nukleoid-assoziierten Proteine nur eine unspezifische Rolle spielten, in dem sie die Funktion anderer Proteine durch den Umbau der DNA erleichtern, ist es zunehmend erwiesen, daß verschiedene oben beschriebener Proteine auch als alleinige Regulatoren von Prozessen agieren. In vielen Regulationsprozessen beeinflussen sich die Nukleoid assoziierten Proteine auch gegenseitig: Die HU-Expression wird durch Fis und Crp reguliert (Claret & Rouviere-Yaniv, 1996), Lrp krümmt DNA in dem regulatorischen Bereich des *gcvT* Gens („glycine-cleavage-system“) kodiert, an der IHF regulierend bindet (Stauffer & Stauffer, 1999), und IHF und FIS konkurrieren um Bindestellen am *fis* Promotor (Pratt *et al.*, 1997).

3. H-NS

Das Protein H-NS (histone-like nucleoid structuring protein), das Thema dieser Arbeit war, wurde zu Beginn der 70-er Jahre als H1 identifiziert (Jacquet *et al.*, 1971; Cukier-Kahn *et al.*, 1972), aber auch später von mehreren anderen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entdeckt und biochemisch charakterisiert. So ist es auch zu erklären, daß für das Protein mehrere Bezeichnungen wie H-NS, H1, H1a, B1 und 16 K existieren, erst die Aufklärung der Primärstruktur ließ erkennen, daß es sich in allen Fällen um das gleiche Protein handelte, das dann fortan nur noch als H-NS bezeichnet wurde. H-NS wurde als eines mit 20.000 Kopien pro Zelle der dominantesten Proteine isoliert, die in *E. coli* mit DNA assoziiert sind (Varshavsky *et al.*, 1977; Spassky *et al.*, 1984), was für die doppelte Funktion als Genomorganisator und Genregulator von entscheidendem Interesse ist.

3.1 Strukturelle Eigenschaften

H-NS ist ein kleines, hitzestabiles Protein mit der Molekularmasse von 15,6 kDa (Falconi *et al.*, 1988). Das nur 137 Aminosäuren kleine Protein ist gekennzeichnet durch einen hohen Anteil an

den Aminosäuren Alanin, Glutaminsäure und Leucin. Im Gegensatz zu den meisten anderen Nukleoid-assoziierten Proteinen, die in der Regel basisch sind, ist H-NS ein neutrales Protein mit ausgeglichener Nettoladung, obwohl es über saure und basische Abschnitte innerhalb des Moleküls verfügt. H-NS kommt in drei verschiedenen Isoformen vor (Spassky *et al.* 1984), die sich nur in ihrem isoelektrischen Punkt pI unterscheiden. So haben die beiden dominierenden Isoformen einen pI von 7,5 bzw. 6,5, die dritte ist weit saurer als die beiden häufigeren Formen (Ussery *et al.* 1994). Da alle drei Formen Genprodukte des selben Gens sind, besteht die Möglichkeit, daß die Proteine posttranslational modifiziert werden (Ussery *et al.* 1994). Jedoch unklar ist, welche Art der Modifizierung stattfindet. Die Funktion der Isoformen ist bisher strittig.

Durch Studien mit verschiedenen verkürzten Proteinderivaten, läßt sich eine funktionelle Aufteilung des Proteins ableiten. Zwei verschiedene Modelle existieren, zum einen wird beschrieben, daß H-NS aus zwei verschiedenen Domänen aufgebaut ist: die N-terminale Domäne dient der Dimerisierung und die C-terminale Domäne vermittelt die DNA-Bindung (Williams *et al.*, 1997). Eine andere Gruppe propagiert einen zusätzlich für die Transkriptionkontrolle zuständigen Abschnitt (Ueguchi *et al.*, 1997). Kristallisationsversuche schlugen bisher in den allen Arbeitsgruppen fehl. Strukturmerkmale der bisher mit NMR untersuchten C-terminalen Struktur von 47 Aminosäuren (Shindo *et al.*, 1995) zeigen keinerlei Gemeinsamkeiten mit bisherigen DNA-Bindeproteinen. Sie besteht aus einer α -Helix und zwei antiparallelen β -Faltblättern. Helix und Faltblätter sind durch einen Loop miteinander verbunden (Abb. 1). Daß diese Domäne an der DNA-Bindung beteiligt ist, fand man mit Fluoreszenzspektroskopie, wobei sich die Umgebung des angeregten Tryptophans in Anwesenheit von DNA, an die H-NS binden konnte, deutlich änderte (Friedrich *et al.* 1988; Tippner & Wagner, 1995).

Wie Studien mit Hilfe chemisch induziertem Crosslinking (Falconi *et al.*, 1988) und Gelfiltration (Spurio *et al.*, 1997) liegt H-NS in der Zelle meist als Homodimer vor. Selbst bei sehr hohen Salzkonzentrationen liegt es stabil als Dimer vor, was zeigt, daß die Interaktion der beiden Monomere hydrophoben Charakter hat und sehr stabil ist (Gualerzi *et al.*, 1986). Bei Konzentrationen über 10^{-4} M können sich auch Trimere, Tetramere und weitere oligomere Strukturen bilden (Falconi *et al.*, 1988). Neuere Experimente zeigten, daß bei Monomer-Konzentrationen zwischen 10-100 μ M das Tetramer die dominierende Form ist (Spurio *et al.*, 1997; Rimsky, unveröffentlichte Daten). Mit der oben genannten Gelfiltration war es jedoch nicht möglich darzustellen, zu welchem oligomeren Zustand H-NS natürlicherweise tendiert, weil sich kein Gleichgewicht herstellen konnte und sich die Dissoziation der Multimere in Abhängigkeit der Verdünnung vollzog. Die sogenannte „large zone“-Gelfiltrationschromatographie (Beckett *et al.*, 1991) umgeht diese Schwäche, in dem den Monomeren mehr Zeit gegeben wird, in der Säule in ein „Selbstassoziationsgleichgewicht“ zu kommen, wodurch sich herausstellte, daß sich außer den Monomeren und Dimeren sich oberhalb einer Konzentration von 10^{-7} M Tetramere etablieren (Ceschini *et al.*, 2000). Die Tetramere werden durch Kationen destabilisiert, was auf eine Mitwirkung von ionischen Bindungen hindeutet, wohingegen Interaktionen zwischen Monomeren durch Kationen stabilisiert werden. Das bedeutet, daß polare Interaktionen die Bildung von Tetrameren aus Dimeren, hingegen starke hydrophobe Kräfte die Bildung von Dimeren

begünstigen. Aufgrund der ungleichen Kräfte die zu Dimeren bzw. Tetrameren führen, kann auf eine unsymmetrische Quartärstruktur geschlossen werden (Ceschini *et al.*, 2000), was Konsequenzen für die Funktionsweise des Proteins hat.

Durch „footprinting“ Experimente konnte gezeigt werden, daß H-NS durch oligomere Strukturen größere DNA-Bereiche an bestimmten Promotoren besetzt (Lucht *et al.*, 1994; Tupper *et al.*, 1994).

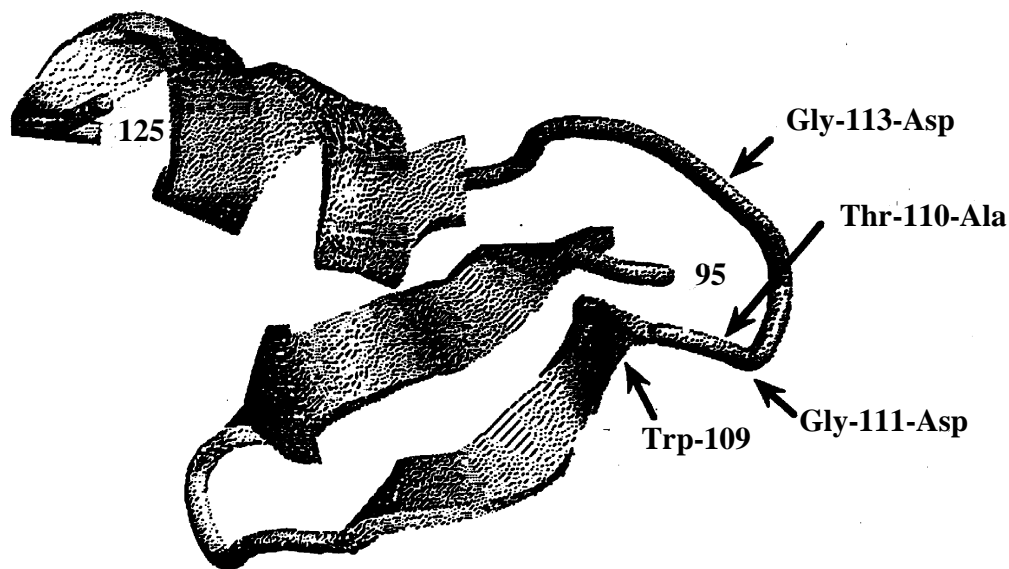


Abb. 1: Modell der C-terminale Domäne von H-NS, abgeleitet aus NMR-Studien (Shindo *et al.*, 1995)

Die eingezeichneten Aminosäureaustausche bezeichnen, die Aminosäuren, die von besonderem Interesse für die Untersuchungen in dieser Arbeit waren. Außerdem ist der für die Fluoreszenzexperimente verwendete Tryptophanrest (Trp-109) markiert.

Bei Vergleich der Aminosäuresequenzen innerhalb der *Enterobacteriaceae* fällt auf, daß sie hoch konserviert sind und eine Homologie zwischen 80 und 100 % aufweisen (La Teana *et al.*, 1989; Marsh & Hillyard, 1990). Die auffällig hohe Homologie weist auf die Wichtigkeit und auf die Parallelität der physiologischen Funktion hin. Zu dem 1992 entdeckten *E. coli*-Protein StpA (Zhang & Belfort, 1992) besitzt H-NS eine Homologie von 58 % auf Aminosäureebene (Shi & Bennett, 1994).

3.2 Interaktion von H-NS mit Nukleinsäuren

H-NS hat Affinität zu allen Nukleinsäuren, jedoch in der Abstufung: gebogene, doppelsträngige DNA > doppelsträngige DNA > einzelsträngige DNA > t-RNA > r-RNA; (Spassky *et al.*, 1984; Gualerzi *et al.*, 1986; Friedrich *et al.* 1988). H-NS kann nahezu überall an die DNA binden (Spassky *et al.*, 1984), wobei das Protein DNA-Abschnitte komplett abdeckt (Tupper *et al.*, 1994). Durch eine Reihe von „footprinting“ Experimenten an verschiedenen Promotoren konnte jedoch nachgewiesen werden, daß H-NS AT-reiche und gebogene Sequenzen bevorzugt (Bracco

et al., 1989; Yamada *et al.*, 1990; Owen-Hughes *et al.*, 1992; Tupper *et al.*, 1994; Lucht *et al.*, 1994). H-NS ist dabei offensichtlich in der Lage ist, zwischen linearer und gekrümmter DNA zu unterscheiden (Ueguchi *et al.*, 1996). H-NS erkennt seine Bindestelle nicht allein aufgrund von Sequenzspezifität, dazu ist die Erkennungsstelle TNTNAN zu fragmentarisch (Rimsky & Spassky, 1990), sondern durch DNA-Biegung, die in den meisten Fällen in AT-reichen Sequenzabschnitten natürlich vorliegt (Koo *et al.*, 1986). Neuere Studien zeigten, daß auch GC-Kurven mit vergleichbarer Präferenz gebunden werden (Spurio *et al.*, 1997), es vielmehr auf die Gesamtarchitektur ankommt, die jedoch mit etwas größerer Wahrscheinlichkeit von AT-Sequenzen ausgebildet wird. Die AT-reichen Regionen stellen somit *cis*-aktive Elemente dar, durch die es gelingt die verschiedenen Promotoren durch selektive Bindung ruhig zu stellen. Wird die natürliche Biegung durch Zugabe von Distamycin entfernt, entfällt die H-NS Bindung (Tippner *et al.*, 1994). Nur im Fall des *proU* Promotors von *S. typhimurium* ist erstmals nachgewiesen, daß H-NS aktiv eine Biegung einführt (Spurio *et al.*, 1997). In mehreren Fällen konnte kooperative Bindung nachgewiesen werden so für die Regulation von *fimB* (Donato *et al.*, 1997) und von *virF* (Falconi *et al.*, 1989) und *proU* (Lucht *et al.*, 1994).

3.3 Globale Regulation von zellphysiologischen Prozessen

H-NS kann die Topologie der DNA ändern. Durch die Bindung von H-NS an die DNA ändert sich die Windungszahl von Plasmiden, H-NS verändert also lokal die Struktur der DNA und beeinflusst das Supercoiling (Hulton *et al.*, 1990; Hinton *et al.*, 1992; Dorman *et al.*, 1990). Der Einfluß auf die Superspiralisierung wurde durch die Beobachtung gestützt, daß H-NS negative Superspiralität in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration einführt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Tupper *et al.*, 1994). H-NS hat aber nicht nur räumlich begrenzte Wirkung, sondern, wie in DNA-„footprints“ Studien gezeigt werden konnte, Auswirkungen auf die Konformation des gesamten Nukleoids (Tippner *et al.*, 1994; Tupper *et al.*, 1994). H-NS kann DNA stark kondensieren (Spassky *et al.*, 1984; Spurio *et al.*, 1992), was auch Auswirkungen über längere Distanz hat. Auch konnte nachgewiesen werden, daß H-NS DNA aktiv, unabhängig von der Sequenz krümmen kann (Spurio *et al.*, 1997), was die Voraussetzung für die räumliche Annäherung weiter auseinander liegender DNA-Abschnitte und ein Strukturprinzip der Nukleoidorganisation ist.

H-NS moduliert die Synthese einer Vielzahl von Genprodukten, die an einer Reihe von verschiedenen, biologischen Prozessen beteiligt sind. Mehrere Arbeitsgruppen haben H-NS als den Regulator von mehr als 40 Genen identifiziert, in dem sie die Proteinmuster von Wildtyp und *hns*-Mutante verglichen (Bertin *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1996; Laurent-Winter *et al.*, 1997). In den meisten Fällen wirkt H-NS als Repressor (McGovern *et al.*, 1994; Spurio *et al.*, 1992), in der Mutante kommt es zu einem 2-20-fachen Anstieg des Genprodukts, für nur eine kleine Anzahl an Genen wirkt H-NS als Aktivator (Tab. 1).

Tab. 1: Einfluß von H-NS auf Transkriptionsebene

Gen	Funktion	Spezies	Stimulus	<i>hns</i> bewirkt Induktion: + Repression: -	Referenz
<i>proU</i>	Transporter für Osmoprotektiva	<i>E. coli</i>	hohe Osmolarität	-	(Higgins <i>et al.</i> , 1988; May <i>et al.</i> , 1990; Ueguchi <i>et al.</i> , 1993; Lucht <i>et al.</i> , 1994; Gowrishankar & Manna, 1996)
<i>proU</i>	Transporter für Osmoprotektiva	<i>S. typhimurium</i>	hohe Osmolarität	-	(Hulton <i>et al.</i> , 1990)
<i>ompC</i>	Porine der Außenmembran	<i>E. coli</i>	hohe Osmolarität	-	(Graeme-Cook <i>et al.</i> , 1989; Bouvier <i>et al.</i> , 1998)
<i>micF</i>	OmpF-Antisense-Regulator	<i>E. coli</i>	hohe Osmolarität	-	(Suzuki <i>et al.</i> , 1996)
<i>osmC</i>	Periplasmatisches Protein	<i>E. coli</i>	hohe Osmolarität	-	(Gutierrez & Devedjian, 1991; Hengge-Aronis, 1996)
<i>osmE</i>	Periplasmatisches Protein	<i>E. coli</i>	hohe Osmolarität	-	(Gutierrez <i>et al.</i> , 1995)
<i>osmY*</i>	Periplasmatisches Protein	<i>E. coli</i>	hohe Osmolarität	-	(Lange & Hengge-Aronis, 1991; Yim <i>et al.</i> , 1994)
<i>nhaA</i>	Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter	<i>E. coli</i>		-	(Dover <i>et al.</i> , 1996)
<i>treA</i>	Periplasmatische TrehalaseA	<i>E. coli</i>	hohe Osmolarität	-	(Repoila & Guitierrez, 1991)
<i>otsBA*</i>	Trehalosephosphat-synthetase	<i>E. coli</i>	hohe Osmolarität	-	(Strøm & Kaasen, 1993; Barth <i>et al.</i> , 1995)
<i>glcS</i>	Glycogensynthese	<i>E. coli</i>	hohe Osmolarität	-	(Hengge-Aronis & Fischer, 1992)
<i>caiF</i>	Aktivator des Carnithin-metabolismus	<i>E. coli</i>		-	(Eichler <i>et al.</i> , 1996)
<i>fixABCX</i>	unbekannt	<i>E. coli</i>		-	(Eichler <i>et al.</i> , 1995)
<i>ilvIH</i>	Isoleucinsynthese	<i>E. coli</i>	niedrige Osmolarität kein Leucin	-	(Levinthal <i>et al.</i> , 1994)
<i>tdh kbl</i>	Threoninabbau	<i>E. coli</i>	Leucin	-	(Landgraf <i>et al.</i> , 1994 Gérard <i>et al.</i> , 1999)
<i>pdh</i>	Pyruvat-Dehydrogenase	<i>E. coli</i>	niedrige P _i -Konz.		(Gérard <i>et al.</i> , 1999)
<i>aniG</i>	unbekannt	<i>S. typhimurium</i>	niedriger pH niedrige Osmolarität Mannose	-	(Karem & Foster, 1993)

Tab. 1: Einfluß von H-NS auf Transkriptionsebene (Fortsetzung)

Gen	Funktion	Spezies	Stimulus	<i>hns</i> bewirkt Induktion: + Repression: -	Referenz
<i>spvR spvB</i>	Virulenz	<i>S. typhimurium</i>	hohe Osmolarität Stationärphase	-	(O'Byrne & Dorman, 1994)
<i>virG</i>	Virulenzfaktor	<i>S. flexneri</i>	hohe Osmolarität		(Tobe <i>et al.</i> , 1995)
<i>virF</i>	Adhäsion und Invasion Aktivator von <i>virB</i> und <i>virG</i>	<i>S. flexneri</i> <i>E. coli</i> (EIEC)	37°C		(Tobe <i>et al.</i> , 1993; Falconi <i>et al.</i> , 1998 Prosseda <i>et al.</i> , 1998)
<i>virB</i>	Aktivator der Virulenzgene	<i>S. flexneri</i>	37°C		(Tobe <i>et al.</i> , 1994)
<i>mxiC</i>	Virulenzfaktor	<i>S. flexneri</i>	hohe Osmolarität 37°C	-	(Porter & Dorman, 1994; Colonna <i>et al.</i> , 1995)
<i>icsA</i>	Virulenzfaktor	<i>S. flexneri</i>	hohe Osmolarität 37°C	-	(Porter & Dorman, 1997)
<i>icsB</i>	Virulenzfaktor	<i>S. flexneri</i>	hohe Osmolarität 37°C	-	(Porter & Dorman, 1994; Colonna <i>et al.</i> , 1995)
<i>ipaBCDA</i>	Virulenzfaktoren Invasion	<i>E. coli</i>	37°C		(Dagberg & Uhlin, 1992)
<i>sfa</i>	S-Fimbrien	<i>E. coli</i>	hohe Osmolarität 37°C	-	(Morschhauser <i>et al.</i> , 1993)
<i>papBA</i>	Pap(P)-Pili	<i>E. coli</i>	37°C	-	(Forsman <i>et al.</i> , 1992; van der Woude & Low, 1994)
<i>papI</i>	Aktivator von <i>papBA</i>	<i>E. coli</i>	37°C		(van der Woude <i>et al.</i> , 1995)
<i>cfaAB</i>	CFA/I-Fimbrien	<i>E. coli</i>	37°C	-	(Jordi <i>et al.</i> , 1994)
<i>fimA</i>	UE der Typ I-Fimbrien	<i>E. coli</i>		-	(Dorman & NiBhriain, 1992)
<i>fimE</i> , <i>fimB</i>	Regulatorproteine der Fimbriensynthesegene	<i>E. coli</i>		-	(Kawula & Orndorff, 1991; Dorman <i>et al.</i> , 1996; Donato <i>et al.</i> , 1997)
<i>fliA</i> <i>flhD</i>	Flagellenproteine	<i>E. coli</i>		+	(Bertin <i>et al.</i> , 1994)
<i>csgBA</i> *	Fibronektin bindende Curli	<i>E. coli</i>	niedrige Temperatur niedrige Osmolarität Wachstumsphase	-	(Arnqvist <i>et al.</i> , 1994; Olsen <i>et al.</i> , 1993)
<i>pef</i>	Plasmid kodierte Fimbrien	<i>S. typhimurium</i>		-	(Nicholson & Low, 2000)
<i>mcc</i>	Microcin B17	<i>E. coli</i>	Wachstumsphase	-	(Moreno <i>et al.</i> , 1992)
<i>mcb</i>	Microcin B17-Precursor	<i>E. coli</i>	Wachstumsphase	-	(Lange & Hengge-Aronis, 1991)

Tab. 1: Einfluß von H-NS auf Transkriptionsebene (Fortsetzung)

Gen	Funktion	Spezies	Stimulus	<i>hns</i> bewirkt Induktion: + Repression: -	Referenz
<i>sfiA</i>	unbekannt	<i>E. coli</i>	Phosphat-Mangel Temperatur , UV	-	(Dri & Moreau, 1994)
<i>bglGFB</i>	Aufnahme und Verwertung von β -Glukosiden (kryptisch)	<i>E. coli</i>		-	(Defez & DeFelice, 1981; Schnetz & Wang, 1996)
<i>cadBA</i>	Lysindecaboxylase	<i>E. coli</i>	niedriger pH Anaerobiosis	-	(Shi <i>et al.</i> , 1993; Shi & Bennett, 1995)
<i>adhI</i>	Arginindecaboxylase	<i>E. coli</i>	niedriger pH Anaerobiosis	-	(Shi <i>et al.</i> , 1993)
<i>tonB</i> <i>tpp</i>	Eisenaufnahme Thymidinphosphory-lase	<i>E. coli</i>	Sauerstoff	-	(Higgins <i>et al.</i> , 1990)
<i>gadA gadB</i> <i>gadC</i>	Glutaminsäure- decarboxylase	<i>E. coli</i>	hoher pH	-	(Yoshida <i>et al.</i> , 1993; De Biase <i>et al.</i> , 1999)
<i>hdeAB*</i> <i>hdeD</i>	Säureresistenz	<i>E. coli</i>	hoher pH	-	(Yoshida <i>et al.</i> , 1993)
<i>hdeD</i>	Säureresistenz	<i>S. flexneri</i>	hoher pH		(Waterman & Small, 1996)
<i>rrnABD</i>	rRNA	<i>E. coli</i>	Wachstumsphase	-	(Tippner <i>et al.</i> , 1994; Afflerbach <i>et al.</i> , 1998)
<i>lysU</i>	Lysyl-tRNA-Synthetase	<i>E. coli</i>	hohe Temperatur	-	(Ito <i>et al.</i> , 1994)
<i>smtA</i>	S-Adenosylmethionin abhängige Methyltransferase	<i>E. coli</i>		+	(Yamanaka <i>et al.</i> , 1995)
<i>fdo</i>	Formatdehydrogenase Z	<i>E. coli</i>		+	(Abaibou <i>et al.</i> , 1995)
<i>csiD</i>	unbekannt	<i>E. coli</i>		+	(Hengge-Aronis, 1996)
kan	Kanamycinresistenz	<i>E. coli</i>		-	(Lejeune <i>et al.</i> , 1989; Yamada <i>et al.</i> , 1991; Bertin <i>et al.</i> , 1992)
<i>ousA</i>	Aufnahme von Osmoprotektiva	<i>E.</i> <i>chrysanthemi</i>		-	(Gouesbet <i>et al.</i> , 1996)
<i>rcaA</i>	Synthese von Kolansäurekapsel- komponenten	<i>E. coli</i>			(Gottesman, 1995; Sledjeski & Gottesman, 1995)
<i>cbpA*</i>	DnaJ Homolog	<i>E. coli</i>	niedrige Phosphat-Konz. Stationärphase	-	(Yamashino <i>et al.</i> , 1994; Yamashino <i>et al.</i> , 1995)
<i>cspA</i>	Kälteschockprotein	<i>E. coli</i>	niedrige Temperatur	-	(Brandi <i>et al.</i> , 1999)
<i>bolA*</i>	Regulation verschiedener Morphogene	<i>E. coli</i>		-	(Lange & Hengge-Aronis, 1991)

Tab. 1: Einfluß von H-NS auf Transkriptionsebene (Fortsetzung)

Gen	Funktion	Spezies	Stimulus	<i>hns</i> bewirkt Induktion: + Repression: -	Referenz
<i>hns</i>	globaler Regulator Nukleoidorganisator	<i>E. coli</i>	Käteschock Wachstumsphase	-	s. II. 3
<i>stpA</i>	RNA-Chaperon	<i>E. coli</i>	kein Leucin	-	(Zhang <i>et al.</i> , 1996; Sonden & Uhlin, 1996)
<i>lrp</i>	globaler Regulator Nukleoidorganisator	<i>E. coli</i>			(Oshima <i>et al.</i> , 1995)
<i>malT</i>	Regulator des Maltoseregulons	<i>E. coli</i>		+	(Johansson <i>et al.</i> , 1998)
<i>appY</i>	Aktivator von Genen des anaeroben Stoffwechsel	<i>E. coli</i>	Wachstumsphase		(Atlung <i>et al.</i> , 1996)

*Die Effekte auf die RpoS abhängigen Gene *osmY*, *otsA*, *bolA*, *hdeAB* und *csgA* sind indirekte Effekte von H-NS und sind eher auf die erhöhten Mengen an RpoS in *hns* Mutanten zurückzuführen.

Wie die Aktivierung abläuft ist noch unklar. H-NS kann seine Repressorwirkung auf zwei möglichen Wegen entfalten, die sich nicht gegenseitig ausschließen, sondern bei unterschiedlichen Promotoren ihre Gültigkeit haben können. Zum einen kann H-NS durch seine Beeinflussung der DNA-Topologie, d.h. durch die Änderung der Superspiralität den Zutritt der RNA-Polymerase erschweren bzw. unmöglich machen (Tupper *et al.*, 1994).

Die veränderte Superspiralität könnte auch die Schnittstelle sein, durch die Umwelteinflüsse auf H-NS Einfluß nehmen. Die Mehrzahl der Gene, deren Expression von H-NS moduliert werden, ist von Umwelteinflüssen wie Osmolarität, Temperatur, O₂-Verfügbarkeit, pH und Wachstumsphasen abhängig.

Eine Beteiligung des Supercoilings an der Wahrnehmung von veränderter Umwelt ist mehrfach gezeigt worden wie für Osmolarität (Higgins *et al.*, 1988; McClellan *et al.*, 1990; Hsieh *et al.*, 1991), Temperatur (Dorman *et al.*, 1990; Falconi *et al.*, 1998), O₂-Verfügbarkeit (Hsieh *et al.*, 1991; Dorman *et al.*, 1988), pH (Karem & Foster, 1993) und Nährstoffgehalt (Balke & Gralla, 1987). Wobei die genannten Einflüsse zum Teil gegenläufige Effekte auf die Superspiralität haben.

Zum anderen kann H-NS direkt mit der RNA-Polymerase um die Bindung im regulatorischen Bereich konkurrieren (Tippner *et al.*, 1994), wobei die H-NS-Bindung nicht auf den Bereich vor dem Strukturgen beschränkt ist, sondern auch wie im Fall von *proU* auch innerhalb des Gens (Göransson *et al.*, 1990; Lucht *et al.*, 1994). H-NS hat wie auch andere Nukleoid-assoziierte Proteine Einfluß auf Replikation, Transposition, Rekombination und Inversion (Tab. 2).

Tab. 2: Effekte von *hns*-Mutationen

Phänotyp	Spezies	Referenz
Multikopien-Suppression eines <i>secY</i> vermittelten Proteinexportdefekts	<i>E. coli</i>	(Ueguchi & Ito, 1992)
Einfluß auf den metastabilen <i>flu</i> Lokus	<i>E. coli</i>	(Diderichson, 1980)
Regulation des Shiga-ähnlichen Toxin II-Operons	<i>E. coli</i>	(Muhldorfer <i>et al.</i> , 1996)
Abnahme der Motilität durch Ausfall der Transkription der Flagellenbiosynthesegene*	<i>E. coli</i>	(Yamada <i>et al.</i> , 1991; Hinton <i>et al.</i> , 1992; Bertin <i>et al.</i> , 1994)
Interaktion mit dem Flagellenmotorprotein FliG zum Zusammenbau des Flagellenmotors*	<i>E. coli</i>	(Marykwas <i>et al.</i> , 1996; Donato & Kawula, 1998)
Erhöhte Sensitivität gegenüber alkalischer Medium und Temperatur	<i>E. coli</i>	(Rowbury & Hussain, 1996)
Attenuation der Virulenz	<i>S. typhimurium</i>	(Harrison <i>et al.</i> , 1994)
Veränderung der Frequenz der temperaturregulierten <i>fimA</i> Phasenvariation	<i>E. coli</i>	(Spears <i>et al.</i> , 1986; May <i>et al.</i> , 1990; Kawula & Orndorff, 1991; Dorman & NiBhriain, 1992)
Erhöhte Stabilisierung der Translation von RpoS	<i>E. coli</i>	(Muffler <i>et al.</i> , 1996)
Verminderte Stabilisierung der Translation von MalT	<i>E. coli</i>	(Johansson <i>et al.</i> , 1998)
Keine Suppression der DNA-Reparatur	<i>S. flexeri</i>	(Palchaudhuri <i>et al.</i> , 1998)
Erhöhte Frequenz von chromosomalen Deletionen	<i>E. coli</i>	(Lejeune & Danchin, 1990)
Erhöhte Frequenz der Transposition des Phagen Mu, stabilisiert Repressor-DNA Interaktion am P _e	<i>E. coli</i>	(Falconi <i>et al.</i> , 1991; Kano <i>et al.</i> , 1993)
Einfluß auf die homologe und konjugationale Rekombination	<i>E. coli</i>	(Dri <i>et al.</i> , 1992)
Einfluß auf <i>hin</i> vermittelte Inversion	<i>E. coli</i>	(Goshima <i>et al.</i> , 1994)
Veränderung der superhelikalen Dichte von Reporterplasmiden	<i>E. coli</i> <i>S. typhimurium</i>	(Higgins <i>et al.</i> , 1988) (Hulton <i>et al.</i> , 1990)
Verminderte Initiation der Chromosomenreplikation	<i>E. coli</i>	(Langer <i>et al.</i> , 1996)
Defekter Mechanismus der Chromosomenaufteilung und der Replikation	<i>E. coli</i>	(Kaidow <i>et al.</i> , 1995; Katayama <i>et al.</i> , 1996)

* Durch die Kombination von Regulation der Flagellenbiosynthese und die direkte Wirkung auf den Flagellenmotor beeinflusst H-NS die Mobilität.

3.4 Regulation der *hns* Expression

Das Gen *hns* wurde in den 80er-Jahren mehrfach kloniert und mit verschiedenen Funktionen in Verbindung gebracht. Beispiele hierfür sind die früheren Bezeichnungen OsmZ als Regulator osmotisch regulierter Gene wie *proU*, BglY für den Regulator des kryptischen *bglGFH* Operons, PilG bei der Regulation der Phasenvariation der TypI-Fimbrien, VirR oder DrdX bei der temperaturabhängigen Expression von Virulenzgenen (Ussery *et al.*, 1994). Aber erst die Aufklärung

der Sequenz (Pon *et al.*, 1988) und die Kartierung des Gens bei etwa 27 min zwischen den Genen *galU* und *tdk* als unabhängige Transkriptionseinheit auf dem Chromosom (May *et al.*, 1990) ließ es zu, die verschiedenen Phänotypen mit dem Ausfall eines einzigen Regulators zu korrelieren (May *et al.*, 1990) und den Genort einheitlich *hns* zu nennen.

Das *hns* Gen ist auf Transkriptionsebene autoreguliert, die Expression in *hns* Mutanten steigt um das 5-fache (Falconi *et al.*, 1993; Dersch *et al.*, 1993; Ueguchi *et al.*, 1993). Fis bindet antagonistisch zu H-NS im Promotorbereich und agiert zu einem als direkter Aktivator der Transkription, zum anderen wirkt Fis der Repression durch H-NS entgegen (Falconi *et al.*, 1996). Weiter ist die Synthese an die Replikation gekoppelt, was im Hinblick auf die Nukleoidorganisation Sinn macht, die Autoregulation ist so eingestellt, daß das Verhältnis H-NS zu DNA immer gleich ist (Free & Dorman, 1995).

Mit Hilfe von Reporterfusionen stellte man einen Anstieg der Transkription um 1,7- (Free & Dorman, 1995) bzw. 3-fache bei Eintritt in die Stationärphase fest (Dersch *et al.*, 1993; Ueguchi *et al.*, 1993). Es handelt sich jedoch nicht um eine wachstumsphasenabhängige Induktion, sondern vielmehr um die Anpassung an die Zunahme der DNA pro Zelle bei Eintritt der Zelle in die Phase verlangsamten Wachstums. Unterbaut wird die These durch Untersuchungen auf mRNA-Ebene, die feststellten, daß die H-NS mRNA beim Überimpfen in neues Medium rasant anstieg und in der Stationärphase abfiel (Laurent-Winter *et al.*, 1995; Free & Dorman, 1995), auch konnte eine Zunahme der H-NS-Menge in der Stationärphase nicht festgestellt werden (Free & Dorman, 1995), was auch mit dem Modus der Autoregulation übereinstimmt.

H-NS wird bei einem Kälteschock von 37°C auf 10°C durch das Kälteschockprotein CspA aktiviert (Brandi *et al.*, 1994) und steigt auf die 3-4-fache Menge (La Teana *et al.*, 1991). Infolge des Kälteschocks kommt es zunächst zu einem Wachstumsstop, der zur Umstellung der Proteinbiosynthese genutzt wird. H-NS scheint essentiell für die Wiederaufnahme des Wachstums zu sein, weil *hns* Mutanten sehr lange in der lag-Phase bleiben (Dersch *et al.*, 1994), auch wenn noch unklar ist, wie die Zelle die reprimierende Wirkung von H-NS umgeht.

Auch eine Osmoregulation konnte für H-NS festgestellt werden. Steigt die Salzkonzentration im Medium von 0 auf 500 mM, fällt die Expression einer *hns-lacZ* Fusion um das 3-4-fache (Dersch, 1995).

3.5 Das H-NS Paralog StpA

Wie bereits erwähnt existiert in *E. coli* ein zu H-NS homologes Protein, das deshalb auch Paralog genannte StpA Protein. Es besitzt zu H-NS 58% Aminosäurehomologie (Zhang & Belfort, 1992). Ursprünglich wurde es als ein Protein, das einer Mutante des Bakteriophagen T4 beim Spleißen (Zhang & Belfort, 1992), bzw. als ein Protein, das einen Phänotyp einer *hns* Mutante komplementieren kann (Shi & Bennett, 1994), entdeckt. Bei *in vitro* Untersuchungen mit gereinigtem StpA und RNA bestätigte sich die RNA-Chaperone-Aktivität von StpA (Zhang *et al.*, 1995). StpA bindet RNA unspezifisch, begünstigt die Entwindung der RNA und erhöht dadurch die Reaktion der am Selbst-Spleißen beteiligten spezifischen Basen. Dabei scheint es jedoch so

zu sein, wie 2D-Elektrophoresen zeigten, daß nur eine geringe Zahl an Genen direkt durch StpA beeinflusst ist, die überwiegende Mehrheit an Effekten war jedoch in einer *hns stpA* Doppelmutante zu beobachten (Zhang *et al.*, 1996). Ähnlich wie H-NS bindet StpA bevorzugt an gekrümmte DNA und kann das Supercoiling einschränken (Cusick & Belfort, 1998). Auch die RNA Chaperon-Aktivität scheint nicht die Funktion zu sein, die StpA von H-NS unterscheidet, weil auch H-NS in *stpA* Mutanten *in vivo* das Spleißen des td Introns stimulieren konnte, jedoch nicht so effizient wie StpA (Zhang *et al.*, 1996). StpA wird als ein molekulares Backup von H-NS angesehen, weil verschiedene physiologische Funktionen der beiden Proteine überlappen, besonders in Hinsicht darauf, daß beide Proteine die Transkription reprimieren können (Zhang *et al.*, 1996; Sonden & Uhlin, 1996). Trotz intakten *stpA* Gens wird der *hns*-Phänotyp jedoch deutlich ausgeprägt wird, so daß durch das Backup kein vollständiger Ersatz der H-NS-Funktionen erreicht wird. *StpA* Transkription läßt sich bei Wachstum in Batchkulturen in Vollmedium, durch osmotischen Schock und in geringem Maß durch Temperaturerhöhung induzieren und ist durch H-NS und Lrp beeinflusst (Free & Dorman, 1997; Sonden & Uhlin, 1996). H-NS und StpA regulieren sich gegenseitig negativ (Williams *et al.*, 1996).

4 Zielsetzung der Arbeit

Wie aus dem bisher beschriebenen deutlich wurde, ist die Aufgabe von H-NS in der Zelle vielseitig. H-NS ist sowohl als Nukleoidorganisator in der Zelle etabliert, als auch als Transkriptionsmodulator aktiv. Der weitreichende Einfluß von *hns* Deletionsmutanten auf eine Vielzahl überwiegend durch die Umwelt regulierte Gene läßt die Untersuchung von *hns* deshalb interessant erscheinen, weil sich H-NS als ein Verknüpfungspunkt vieler zentraler Schalter im Netzwerk darstellt. Zum einen soll diese Arbeit weitere physiologische Einflüsse von H-NS auf die Zelle thematisieren. Zum anderen sollen Aussagen über die Zuordnung von bestimmten Strukturabschnitten zu Funktionen des Proteins aufgrund von Mutantanalyse gewonnen werden. Infolge der Experimente und ihre Einordnung in die zum Thema veröffentlichten Literatur soll die Arbeit Aufschluß über das Regulationsnetzwerk geben, in das H-NS eingebettet ist.

III. Material und Methoden

1 Chemikalien und Materialien

Sofern im Text nicht gesondert darauf hingewiesen wird, wurden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien von folgenden Firmen bezogen: Boehringer Mannheim (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), Qiagen (Hilden) und Sigma (Deisenhofen). Die verwendeten Komplexmedien stammten von der Firma Difco (Augsburg).

2 Bakterienstämme und Plasmide

In Tab. 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und in Tab. 4 die verwendeten Plasmide aufgeführt. Alle *E. coli*-Stämme sind Derivate von *E. coli* K-12 mit Ausnahme des Stammes BL21, welcher zu den Derivaten von *E. coli* B gehört.

Tab. 3: Verwendete Bakterienstämme von *E. coli*

Stamm	Genotyp/ Beschreibung	Referenz
ALP3	MC4100 Φ (<i>proU-lacZ</i>) <i>hyb2</i> (λ <i>placMu15</i>) <i>hns229</i>	Perraud, 1994
APL4	MC4100 Φ (<i>proU-lacZ</i>) <i>hyb2</i> (λ <i>placMu15</i>) <i>hns230</i>	Perraud, 1994
BL21	F ⁻ <i>gal met r^m hsdS</i> λ <i>lys</i> <i>placUV5-T7-gene 1 placI^q</i>	Studier & Moffatt, 1986
DH5 α	F ⁻ λ <i>E44</i> Δ (<i>argF-lac</i>) <i>U169</i> ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ 15 <i>hsdR17 recA1 endA1 gyr96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
EMG2	F ⁻ λ ⁺	Link <i>et al.</i> , 1997
GE1806	Hfr KL16 <i>recA56 srl::Tn10</i>	G. Weinstock
GF1	UT5600 λ <i>lys</i> <i>placUV5-T7-gene 1 placI^q</i>	G. Forrest, 1995
GF3	UT5600 λ <i>lys</i> <i>placUV5-T7-gene 1 placI^q</i> <i>hns206::bla</i>	G. Forrest, 1995
GM37	MC4100 Φ (<i>proU-lacZ</i>) <i>hyb2</i> (λ <i>placMu15</i>)	May <i>et al.</i> , 1986
IMW189	MC4100 Φ (<i>frdA-lacZ</i>) <i>hyb2 bla⁺ hns205::Tn10</i>	B. Ziegler, 96
JML7	MC4100 Φ (<i>proU-lacZ</i>) <i>hyb2</i> (λ <i>placMu15</i>) <i>hns208</i>	J.M. Lucht
JML10	MC4100 Φ (<i>proU-lacZ</i>) <i>hyb2</i> (λ <i>placMu15</i>) <i>hns210</i>	J.M. Lucht
LEPRT7	F ⁻ <i>e14⁻(mcrA) supF58 supE44 hsdR514 (r^m⁺) galK2 galT22 trpR55 metB1 lacY1 tonA</i> λ <i>lys</i> <i>placUV5-T7-gene 1 placI^q</i>	Fedorova <i>et al.</i> , 1996
MC4100	F ⁻ <i>araD139</i> Δ (<i>argF-lac</i>) <i>U169 rps L150 relA1 flbB530 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Casadaban, 1976

Tab. 3: Verwendete Bakterienstämme von *E. coli* (Fortsetzung)

Stamm	Genotyp/ Beschreibung	Referenz
MC4100λJ100	MC4100 Φ(<i>frdA-lacZ</i>) <i>hyb2 bla</i> ⁺	Jones & Gunzalus, 1987
PD32	MC4100 <i>hns206::bla</i>	P.Dersch, 1994
PD117	GM37 <i>recA56 srl::Tn10</i>	P.Dersch, 1994
PD119	GM37 <i>recA56 srl::Tn10 hns206::bla</i>	P.Dersch, 1994
PD124	GM37 <i>trpB114::Tn10 recA::cat</i>	P.Dersch, 1994
PD145	MC4100 <i>hns205::Tn10</i>	P.Dersch, 1994
SK2	MC4100 <i>malF::Tn10</i>	S. Kneip, 1994
TG1	F ⁻ Δ(<i>lac-pro</i>) <i>supE thi hsdR5 traD36 proA⁺B⁺ lacI^q</i> <i>lacZΔM15</i>	Carter <i>et al.</i> , 1985
W3110	F ⁻ λ ⁻ (<i>rrnD⁻-rrnE⁻</i>)1	Bachmann, 1987
BZ2	MC4100 <i>malF::Tn10 recA::cat</i>	diese Arbeit
BZ3	MC4100 <i>malF::Tn10 recA::cat hns206::bla</i>	diese Arbeit
BZ5	JML7 <i>malF::Tn10</i>	diese Arbeit
BZ6	JML10 <i>malF::Tn10</i>	diese Arbeit
BZ7	ALP3 <i>malF::Tn10</i>	diese Arbeit
BZ8	ALP4 <i>malF::Tn10</i>	diese Arbeit
BZ27	SK2 <i>hns206:: bla</i>	diese Arbeit
BZ28	GM37 <i>hns206:: bla</i>	diese Arbeit
BZ35	LEPRT7 <i>hns206:: bla</i>	diese Arbeit
BZ52	W3110 Δ <i>lacZ</i> Φ(<i>proU-lacZ</i>) <i>hyb2</i> (λ <i>placMu15</i>)	diese Arbeit
BZ53	W3110 Δ <i>lacZ</i> Φ(<i>proU-lacZ</i>) <i>hyb2</i> (λ <i>placMu15</i>) <i>hns206:: bla</i>	diese Arbeit

Die Bezeichnung der Gene entspricht der von Bachmann (1990) vorgeschlagenen Nomenklatur. Das griechische Symbol Φ weist auf eine Genfusion hin, die Abkürzung *hyb* kennzeichnet eine Genfusion, die für ein Hybridprotein codiert. Die Bezeichnung λDE3 bezeichnet einen Stamm, in dem das T7-RNA-Polymerasegen unter *lacPO* Kontrolle steht, und mit Hilfe eines λ Phagen in das *E. coli* Chromosom integriert wurde.

Tab. 4 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pALP1	<i>hns-224</i> Derivat von pPD3	Perraud, 1994
^a pBAD33	<i>araC</i> Cml ^r , pACYC ori	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pGM7	<i>hns</i> ⁺ -Derivat von ^c pHSG575	May <i>et al.</i> , 1986
pJL28	„high-copy-number“ <i>lacZ</i> Proteinfusionsvektor	Jan M. Lucht, 1989t
pKS4	<i>hns</i> ⁺ -Derivat von pGP20, Tet ^r	Dersch <i>et al.</i> , 1993
pOS7	Φ(<i>proU-lacZ</i>) <i>hyb2</i> , Amp ^r	May <i>et al.</i> , 1986

Tab. 4 Plasmide (Fortsetzung)

Plasmid	Beschreibung	Referenz
^c pPD1	„low-copy-number“ Expressionsvektor mit T7 Φ 10-Promotor, ^b pHSG575-Derivat, Cml ^r , Polylinker von pPD98	Dersch <i>et al.</i> , 1994
^c pPD100	„low-copy-number“ Expressionsvektor mit T7 Φ 10-Promotor, ^b pHSG575-Derivat, Cml ^r	Dersch <i>et al.</i> , 1994
pPD3	<i>hns</i> ⁺ -Derivat von pPD100, Cml ^r	Dersch, 1993
pPD102	<i>hns</i> 222-Derivat von pPD100, Cml ^r	Dersch <i>et al.</i> , 1994
pPD103	<i>hns</i> 223-Derivat von pPD100, Cml ^r	Dersch <i>et al.</i> , 1994
pPD104	<i>hns</i> 219-Derivat von pPD100, Cml ^r	Dersch <i>et al.</i> , 1994
pPD106	<i>hns</i> 214-Derivat von pPD100, Cml ^r	Dersch <i>et al.</i> , 1994
pJB010	<i>gbsB</i> ⁺ -Derivat von pPD100, Cml ^r	Boch <i>et al.</i> , 1996
pSK3	<i>stpA</i> ⁺ -Derivat von pPD100, Cml ^r	Dersch, 1993
^d pKO3	Temperatur-sensitives Integrationsplasmid, Cml ^r	Link <i>et al.</i> , 1997
pBZ1	Φ (<i>hns-lacZ</i>)hyb1-Derivat des pPD3	diese Arbeit
pBZ2	Φ (<i>hns-lacZ</i>)hyb1-Derivat des pKO3, <i>lacZ</i> wurde in die <i>HpaI</i> - Schnittstelle von <i>hns</i> eingefügt, Cml ^r	diese Arbeit
pBZ3	<i>hns</i> ⁺ -Derivat von pBAD33, Cml ^r	diese Arbeit
pBZ4	<i>hns</i> 208-Derivat von pBAD33, Cml ^r	diese Arbeit
pBZ5	<i>hns</i> 210-Derivat von pBAD33, Cml ^r	diese Arbeit
pBZ6	<i>hns</i> 229-Derivat von pBAD33, Cml ^r	diese Arbeit
pBZ7	<i>hns</i> 230-Derivat von pBAD33, Cml ^r	diese Arbeit
pBZ8	<i>hns</i> ⁺ -Derivat von pPD100, Cml ^r	diese Arbeit
pBZ9	<i>hns</i> 208-Derivat von pPD100, Cml ^r	diese Arbeit
pBZ10	<i>hns</i> 210-Derivat von pPD100, Cml ^r	diese Arbeit
pBZ11	<i>hns</i> 229-Derivat von pPD100, Cml ^r	diese Arbeit
pBZ12	<i>hns</i> 230-Derivat von pPD100, Cml ^r	diese Arbeit
pBZ13	<i>hns</i> 233-Derivat von pPD100, Cml ^r	diese Arbeit
pBZ14	<i>hns</i> 233-Derivat von pBAD33, Cml ^r	diese Arbeit

Amp^r, Cml^r, Kan^r, Spec^r und Tet^r sind Antibiotikaresistenzen gegen Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Spectinomycin und Tetracyclin. ^apBAD33 gehört zu den Expressionsvektoren, die in geringer Kopienzahl vorliegen und bei denen die Expression vom pBAD-Promotor mit Arabinose induziert werden kann (Guzman *et al.*, 1995). ^bpHSG575 gehört zu den Klonierungsvektoren, die in niedriger Kopienzahl vorliegen und Chloramphenicol-Resistenzkassette (Takeshita *et al.*, 1987) trägt. ^cpPD1 und pPD100 (Dersch *et al.*, 1994) sind Expressionsvektoren, die in geringer Kopienzahl in der Zelle vorliegen. Beide tragen eine Chloramphenicol-Resistenzkassette. ^dpKO3 dient als Integrationsvektor, der aufgrund seines temperatursensitiven Replikationsursprunges zur Erstellung von Genmodifikationen an authentischen Genloci im Chromosom geeignet ist, er trägt eine Chloramphenicol-Resistenzkassette (Link *et al.*, 1997).

3 Medien und Zusätze

3.1 Vollmedien und Minimalmedien

Vollmedien und Minimalmedien wurden nach (Silhavy *et al.*, 1984; Sambrook *et al.*, 1989; Miller, 1992) hergestellt. Folgende Medien wurden verwendet:

LB	Luria-Bertani
DYT	Double-Yeast-Trypton
MMA	Minimalmedium A
M9	Minimalmedium mit M9-Salzen

Die eingewogenen Substanzen wurden mit destilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert. Bei Überexpressionsexperimenten mit Vektoren, die den T7 Φ 10-Promotor trugen wurde M9 mit 0,4 % Glukose, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄ und 0,4 % Casamino-säuren verwendet. Die Osmolarität flüssiger Medien wurde durch Zugabe verschiedener Konzentrationen an NaCl erhöht. Die osmotische Induktion des *proU*-Promotors erfolgte durch die Zugabe von 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM und 300 mM an NaCl. Die Osmolaritäten wurden durch Gefrierpunktserniedrigung mit Hilfe eines Osmometers (Wescor, Vapor Pressure Osmometer, Typ 5500) bestimmt. Für feste Medien wurde 15 g Agar auf 1 L Flüssigmedium eingewogen.

3.2 Indikatormedien

Bromthymolblau-Salicin (BS)-Platten (Schnetzer *et al.*, 1987) ermöglichten die Unterscheidung, ob der betreffende *E. coli*-Stamm in der Lage ist, β -Glucoside zu verwerten, weil er das cryptische *bgl*-Operon anschalten kann. Die Kolonien waren gelb gefärbt und somit Bgl⁺, wenn der Mikroorganismus Salicin metabolisieren kann. Wenn Salicin nicht verwertet werden konnte, waren die Kolonien blau gefärbt und zeigten den Bgl⁻-Phänotyp. Die Gelbfärbung wurde durch den Farbumschlag des Indikators Bromthymolblau von blau nach gelb verursacht, der die Säuren, die durch die Verwertung des Zuckers Salicin entstanden sind, anzeigt.

Zusammensetzung des BS-Indikatormediums:

22,5 g Antibiotika-Medium 2 (Difco-Laboratories)
4 g Agar
in 940 ml destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert

nach dem Autoklavieren Zugabe von:

50 ml einer 10 % sterilfiltrierten Salicinlösung
10 ml einer 2 % Bromthymolblaulösung in 50 % Ethanol
0,2 N NaOH

Die Lactoseverwertung wurde mittels Lactose-McConkey-Platten (Miller, 1992) untersucht. Wenn Lactose metabolisiert werden konnte, waren die Kolonien rot und somit Lac^+ . Lac^- -Kolonien waren farblos. Die durch die Verwertung der Laktose verursachte Säurebildung bewirkt, daß der Indikator Neutralrot von farblos nach rot umschlägt.

3.3 Zusätze und Antibiotika

Um Bakterien mit der Fähigkeit zur α -Komplementation zu identifizieren, wurde der Indikatorfarbstoff X-Gal für den Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität in einer Endkonzentration von 0,3 mg/ml den Agarplatten zugegeben. Zur Induktion des *lac*-Promotors wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM den Medien zugesetzt. Zum Test der Maltose-Verwertung wurden MMA-Platten mit bzw. ohne die entsprechende Kohlenstoff(C)-Quelle verwendet.

Medienzusätze wie Salze, Aminosäuren und Antibiotika wurden, wenn nicht anders angegeben in destilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert oder autoklaviert und als sterile Stammlösungen zu den auf 50°C abgekühlten, sterilen Medien zugesetzt. Es wurden folgende Konzentrationen verwendet:

	Stammlösung	Endkonzentration
Salze		
CaCl_2	10 mM	1 mM
MgSO_4	1 M	1 mM
C/AS-Quelle		
Glucose	20 %	0,2 oder 0,4%
Maltose	20 %	0,2 %
Salicin	10 %	0,2 %
Na-Succinat	1 M	20 mM
Na-Fumarat	1 M	20 mM bzw. 50 mM
Casaminosäuren (CAS)	20 %	0,1 oder 0,2%
Tryptophan	5 %	0,5 %
Antibiotika		
Ampicillin	100 mg/ml H_2O	100 $\mu\text{g/ml}$
Chloramphenicol	30 mg/ml Ethanol	30 $\mu\text{g/ml}$
Kanamycin	50 mg/ml H_2O	50 $\mu\text{g/ml}$
Rifampicin	20 mg/ml Methanol	200 $\mu\text{g/ml}$
Spectinomycin	50 mg/ml H_2O	50 $\mu\text{g/ml}$
Streptomycin	50 mg/ml H_2O	50 $\mu\text{g/ml}$
Tetracyclin	5 mg/ml Ethanol	5 mg/ml

4 Mikrobiologische Methoden

4.1 Wachstumsbedingungen

Die Anzucht von Bakterienkulturen erfolgte ausgehend von Einzelkolonien bei 37°C auf Festmedien oder in Flüssigkulturen. Kulturen mit einem Volumen bis zu 10 ml wurden in Reagenz-

glasrollern inkubiert, größere Volumina wurden in Erlenmeyerkolben unter starker Belüftung auf Schütteltischen bei 220 rpm angezogen. Kulturen auf Festmedien wurden in Temperatur konstanten Brutschränken inkubiert.

Für die aeroben Hauptkulturen wurden Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet und die Kulturen wurden unter Schütteln bei 220 rpm bei 37 °C inkubiert. Für die Experimente mit der *hns205*-Mutante sowie dem entsprechenden Parentalstamm wurden 1 l-Kolben mit M9-Medium mit entsprechendem Substrat und Zusätzen verwendet. Das Kulturvolumen betrug maximal 10 % des Gefäßvolumens.

Anaerobe Zuchten wurden in Zuchtgefäßen angesetzt, die sich durch Gummistopfen abdichten ließen. Experimente zur Messung der optischen Dichte und der β -Galaktosidaseaktivität mit *hns205*-Mutanten und dem entsprechenden Parentalstamm wurden in 150 ml-Müller-Krempel-Flaschen mit 50 ml Medium durchgeführt. Fumarat wurde hier als Elektronenakzeptor eingesetzt und in einer Konzentration von 50 mM zugegeben, im Unterschied zu der Menge von 20 mM, die zugegeben wird, wenn Fumarat C-Quelle ist. Eine sterile Kanüle wurde durch den Stopfen, der zuvor mit Rotisol® desinfiziert wurde, geführt und an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Das Gas in den Zuchtgefäßen wurde durch Wasserstrahlvakuum entzogen und durch Begasen mit Sauerstoff-freien Stickstoff ersetzt. Das Vakuumziehen und Begasen wurde jeweils 3 x wiederholt. Die Dauer war abhängig vom Volumen des Kulturgefäßes. Zum Beschleunigen des Gasaustausches wurde mit einem Gummistopfen gegen die Gefäßwand geklopft.

Aerobe Kulturen wurden mit 1 % , anaerobe mit 2 % Inokulum angeimft.

4.2 Zelldichtebestimmung

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde photometrisch durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD_{578}) in einem Spektralphotometer (Pharmacia LKB, Ultraspec III) bestimmt. Eine OD_{578} von 1 entspricht einer Zelldichte von ca. 10^9 Zellen/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Das jeweilige Wachstumsmedium diente als Referenz.

4.3 Konfokale Mikroskopie

4.3.1 Herstellung der Zellpräparate

Die Stämme GF1 und GF3 mit den Überexpressionsplasmiden pPD3, pALP1, pPD100, pJB010, pPD102-106, pBZ10 und pBZ14 wurden in MMA-Medium mit entsprechenden Zusätzen und Chloramphenicol bis zu einer OD_{578} von 0,3 gezogen. Die frühe Induktion sollte ermöglichen, daß sich die Zellen bei der Ernte noch in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Die Kulturen wurden in 2 Kulturgefäße aufgeteilt. Mit IPTG-Zugabe wurde in jeweils einem dieser Kolben die Expression der verschiedenen *hns*-Derivate induziert (s. III.7.6). Nach zweistündiger Induktion wurden 2 ml Zellen geerntet, mit 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen, um das Medium vollständig zu entfernen, und doppelt konzentriert in der gleichen Lösung aufgenommen. 10 μ l Zellsuspension wird auf Objektträger getropft, Luft getrocknet, mit einem Tropfen Methanol

fixiert und das Methanol mit destilliertem Wasser abgewaschen und erneut getrocknet. Die so behandelten Proben können bei RT oder bei -20°C gelagert werden. Eiskristalle können jedoch die Zellen aufbrechen, so daß in der Regel die Präparate bei RT aufbewahrt wurden.

4.3.2 Spezifische Färbung von Proteinen

Der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) bindet an Proteine und eignet sich für deren spezifische Anfärbung (Haughland, 1995). Bei Proben, die mit Methanol fixiert wurden, sind alle Proteine der Zelle zugänglich, die gesamte Zelle wird angefärbt. Der Farbstoff FITC (0,5 mg/ml) wird in einem Gemisch aus 0,5 M Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9,5, 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,1 und 0,9 %-iger NaCl-Lösung gelöst und auf das Präparat getropft. Nach 3 min wird mit Carbonat-Bicarbonat-Puffer gewaschen und der Farbstoff mit Natrium-pyrophosphat-Lösung stabilisiert. Die gefärbten Präparate sind mehrere Stunden haltbar.

4.5.3 Spezifische Färbung von DNA

Der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff 4,6-Diamino-2-Phenyl-Indol (DAPI), interkaliert zwischen die Nukleinsäuren der DNA. Er färbt dabei allein DNA und keine anderen Nukleinsäuren. Verwendet wird das Reagenz Vectrashield® (Vector Laboratories, Inc. Burlingame), ein Mounting-Medium, das 1,5 µg/ml DAPI enthält. 10 µl wird auf die Methanol fixierten oder die bereits mit FITC gefärbten Präparate gegeben und das Präparat mit einem Deckglas abgedeckt.

4.3.4 Mikroskopie

Verwendet wurde das konfokale Laserscanning-Mikroskop Leica TS, das über einen Argon-Krypton-Mischgaslaser verfügt. Die Steuerung des Lasers und der verschiedenen Filter erfolgte über einen Computer. Die Bilder werden mittels einer Videoanlage aufgenommen und über eine spezielle Software von Leica bearbeitet.

Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie, die seit Mitte der 70er Jahre auch für das Studieren biologischer Präparate eingesetzt wurde (Brakenhoff *et al.*, 1979; Pawley & Centonze, 1998; Sheppard & Shotton, 1997), hat gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie mehrere Vorteile. Zum einen wird der Verlust an Auflösung durch den hohen Streulichtanteil einer einzelnen Ebene des Präparats, dadurch umgangen wird, daß mehrere Bildebenen des Präparats nacheinander mit punktförmigen Laserlicht durchgescannt werden und die aufgenommenen Bilder übereinandergelegt werden. Zum anderen werden nur Strukturen, die unmittelbar in der Brennebene des Mikroskopobjektivs liegen, abgebildet. Das anregende Laserlicht passiert erst den Anregungsfilter, tritt dann durch das Quellpinhole, was die Strahlenbreite festlegt und wird durch den dichromatischen Spiegel (Strahlenteiler) reflektiert. Dieser Spiegel reflektiert das Anregungslicht in Richtung des Objektes, läßt aber emittiertes Licht in Richtung des Photodetektors durch. Die Bewegung des punktförmigen Lichtstrahls über das Objekt wird durch den Scannspiegel

ermöglicht. Die Fokussierung des Lichtstrahls auf die konfokale Objektebene wird durch das Mikroskopobjektiv geleistet. Das gesamte emittierte Licht passiert das Objektiv, aber nur dasjenige emittierte Licht, das in der konfokalen Ebene des Objektes liegt, kann das Detektorpinhole passieren und vom Photodetektor wahrgenommen werden. Objektiv und Zoomfaktor der Software ermöglichten eine Vergrößerung nahe der Auflösungsgrenze von Licht (von zirka 3000-5000fach). Die Präparate wurden für die FITC-Färbung bei der Wellenlänge 488 nm und für die DAPI-Färbung bei 365 nm angeregt. Für die FITC-Färbung wurde ein Bandpaßfilter von 520 +/- 15 nm, für die DAPI-Färbung ein Filter 440 +/- 20 nm verwendet.

5 Genetische und molekularbiologische Methoden

5.1 Testen von Bakterienstämmen auf Mutation im *recA*-Gen

RecA spielt eine entscheidende Rolle bei der DNA-Reparatur und wird durch UV-Licht induziert. Werden Zellen mit UV-Licht bestrahlt, entstehen Zellschäden, die nur in Anwesenheit von RecA repariert werden können. Zu testende Stämme werden von Einzelkolonien ausgehend entlang der gesamten Plattenbreite auf LB ausgestrichen. Als Kontrolle dient ein *recA*⁺- und ein *recA*⁻-Stamm. Eine Seite der Ausstrichs wird bei geöffneter Platte mit UV-undurchlässigem Material abgedeckt. Die Bestrahlung und alle weiteren Arbeiten werden bei Rotlicht im UV-Stratalinker® 2400, Heidelberg mit 10 mJ durchgeführt. Die Platten werden geschlossen und in Aluminiumfolie gewickelt bei 37°C inkubiert. *RecA*⁻-Stämme wachsen nur auf der unbestrahlten Seite.

5.2 DNA-Isolation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) angewandt oder der QIAGEN-Plasmid-Kid (Qiagen, Düsseldorf) nach Angaben des Herstellers benutzt. Chromosomale DNA aus *E. coli* wurde von 10 ml aus LB-Kulturen mit Hilfe DNA-bindender Säulen der Firma QIAGEN (QIAGEN tip 20) gereinigt. Die Konzentration und die Reinheit der DNA wurden photometrisch (Pharmacia LKB, Ultrospec III) bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1 entsprach dabei einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA. Die Reinheit der DNA errechnete sich aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine) (Sambrook *et al.*, 1989). Als Referenz diente das jeweilige Lösungsmittel.

5.3 Klonierungstechniken

DNA-Restriktionen wurden mit den entsprechenden Enzymen nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die Auftrennung und Isolierung der DNA-Fragmente erfolgte über Agarosegele. Mittels des GenClean-Kits (Bio 101 Inc., La Jolla, CA) wurde die DNA aus Gelstücken eluiert.

Dephosphorylierung der Vektorenden und Ligation wurde nach Standardmethoden (Sambrook, *et al.*, 1989) durchgeführt.

5.4 Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in Abhängigkeit der Größe in 0,8-1,2% Agarosegelen aufgetrennt (Sambrook, *et al.*, 1989). Mit Ethidiumbromidlösung (1µg/ml) wurde die DNA angefärbt und unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und mit einem Videoprinter (Biotec-Fischer) photographiert.

5.5 Transformation von *E. coli*

Die zu transformierenden *E. coli*-Zellen wurden für die Transformation mit Plasmid-DNA nach der von (Sambrook, *et al.*, 1989) beschriebenen CaCl₂-Methode kompetent gemacht und 1 µl Plasmid-DNA hinzu gegeben. Ligierte DNA und geringer konzentrierte Plasmid-DNA wurde durch Elektroporation (Gene-Pulser, Bio-Rad, Hercules, CA USA) in den Rezipientenstamm transformiert. Der Rezipientenstamm wurde hierzu in der exponentiellen Phase bei einer OD₅₇₈ von 0,5 -0,8 geerntet, dreimal mit 4°C kaltem Wasser und einmal mit 10 % Glycerin gewaschen und in 1/500 Volumen 10 % Glycerin aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml LB bei 37°C inkubiert, damit die entsprechende Antibiotikaresistenz exprimiert werden kann, und auf 37°C vorgewärmten Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

Vom Standardprotokoll wich die Transformation ab, wenn man das temperatursensitive Integrationsplasmid pKO3 für die Rekombination *in vitro* modifizierter Gene am authentischen Genort im *E. coli* Chromosom verwendet wurde (Link *et al.*, 1997). Die einstündige, phänotypische Expression der Antibiotikaresistenz von pKO3 fand bei der permissiven Temperatur von 30°C statt. Im Anschluß wurden die Zellsuspensionen auf bereits auf 42°C (nicht permissive Temperatur) vorgewärmte LB-Platten mit Chloramphenicol ausplattiert und bei 42°C inkubiert. Mit Chloramphenicol übt man einen Selektionsdruck auf das einfache Rekombinationsereignis aus, bei dem der gesamte Vektor in das Genom integriert. Cml^r-resistente Zellen wurden auf LB-Platten, die X-Gal bzw. ein weiteres Antibiotikum und 5 % Sucrose enthielten, ausgestrichen, um auf doppelte Rekombination zu selektieren. Bakterien, die auf Sucrose-X-Gal-Platten bzw. Sucrose-Antibiotika-Platten wuchsen, wurden auf den Verlust der Cml^r überprüft. Das gewünschte Rekombinationsereignis lag vor, wenn die Bakterien nur noch den gewünschten, genetischen Marker enthielten, die Cml^r jedoch verloren hatten.

5.6 P1_{vir}-vermittelte Transduktion

Die Präparation von Phagenlysaten, ihre Reinigung und Vermehrung sowie die Resistenz- und Sensitivitätstests erfolgten nach den in (Miller, 1992) und (Silhavy *et al.*, 1984) beschriebenen Methoden. Für die Herstellung eines Phagenlysates aus infizierten Stämmen wurden 50 µl an

Starterlysat des Phagen P1*vir* (Laborsammlung), der an Lipopolysaccharide der Zellmembran andockt, eingesetzt. Um ein Lysat aus Stämmen zu gewinnen, die das Allel *hns206* tragen, wurden 300 µl P1*vir*-Starterlysat eingesetzt. Die P1*vir*-vermittelte Transduktion erfolgte standardisiert mit 0,2 ml einer in LB gewachsenen Übernachtskultur und 0,1 ml Phagenlysat. Nur für die Transduktion der *hns206::bla*-Insertion wurden jeweils 300 µl des Phagenlysats verwendet. Die Infektion wurde 20 min bei 37°C durchgeführt und durch Ausplattieren der infizierten Zellen auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmarker und 20 mM NaCit abgestoppt.

5.7 Plasmidkonstruktionen

pBZ1: Aus dem Plasmid pJL28 wurde mit *DraI* ein 3358 bp-Fragment herausgeschnitten und auf eine Länge von 3125 bp mit *SmaI* verkürzt. Das Fragment trägt das vollständige *lacZ*-Gen. Dieses Fragment wurde in den mit *HpaI* geöffneten pPD3 ligiert. Daraus resultiert das Plasmid pBZ1 (Abb. 2), welches das *hns*-Gen mit dem kompletten Promotorbereich trägt. Das *lacZ*-Gen wurde nach der 57.Base, eingefügt. Am 5'-Ende ist das *lacZ*-Gen von 171 bp des *hns*-Strukturgens zusätzlich des Promotorbereichs von 205 bp und am 3'-Ende von 360 bp umgeben. Die *hns*-Sequenz ist von mehr als 300 bp zu beiden Seiten des *lacZ*-Gens umgeben, womit die Mindestanforderungen für die Rekombination am authentischen Ort erfüllt sind. Zusätzliche homologe Sequenzen für die Rekombination kommen hinzu, weil bei der Konstruktion des verwendeten Ausgangsplasmid pPD3 ein größer chromosomaler Bereich, ein 2875 bp *SalI*-Fragment, der *hns*-Region in das Plasmid pPD1 kloniert wurde (Dersch, 1993). Dieses Fragment bleibt bei der weiteren Klonierung nahezu komplett erhalten. Der Übergang der *hns-lacZ*-Fusion wurde durch Sequenzierung mit dem Primer lacZ-40 überprüft.

pBZ2: Aus dem Plasmid pBZ1 wurde mit *SmaI* und *XmnI* ein 5839 bp-Fragment herausgeschnitten und in den mit *SmaI* geöffneten pKO3 ligiert (Abb. 2).

pBZ3, pBZ4, pBZ5, pBZ6 und pBZ7: Unter Verwendung der Primer Hns1 und Hns2 (Tab.5) die eine *KpnI* bzw. eine *SacI*-Schnittstelle erzeugen, wurde mittels PCR ein 654 bp großes Fragment aus dem *E. coli* Chromosom amplifiziert. Für das intakte *hns*-Gen wurde für die Präparation der chromosomalen DNA der Stamm MC4100 verwendet und die Stämme JML7, JML10, ALP3 und ALP4 für die Amplifikation der entsprechenden *hns*- Punktmutationen (*hns208*, *hns210*, *hns229* und *hns230*). Die PCR-Fragmente wurden mit *KpnI* und *SacI* geschnitten, gereinigt und in das ebenso geschnittene pBAD33-Plasmid ligiert. Durch Sequenzierung mit den Primern Hns3 und Hns4 (Tab.5) wurden die Konstrukte überprüft. Die entstandenen Plasmide ermöglichen eine durch Arabinose induzierte Expression von *hns* bzw. *hns**.

pBZ8, pBZ9 pBZ10, pBZ11, pBZ13: Aus den Plasmiden pBZ3, pBZ4, pBZ5, pBZ6 und pBZ7 wurde mit *EcoRI* und *HindIII* ein 800 bp großes, das *hns*-Gen enthaltende-Fragment herausgeschnitten und in das ebenso geöffnete pPD100-Plasmid ligiert. Die entstanden Plasmide ermöglichen eine durch IPTG induzierte Expression von *hns* bzw. *hns**.

pBZ14: Dieses Plasmid ist durch Ablesefehler der T4-Polymerase während der PCR entstanden. Es trägt eine Punktmutation in der zweiten Base des 14. Codons, wodurch es zum AS-Austausch von einem Leucin zu einem Prolin kommt.

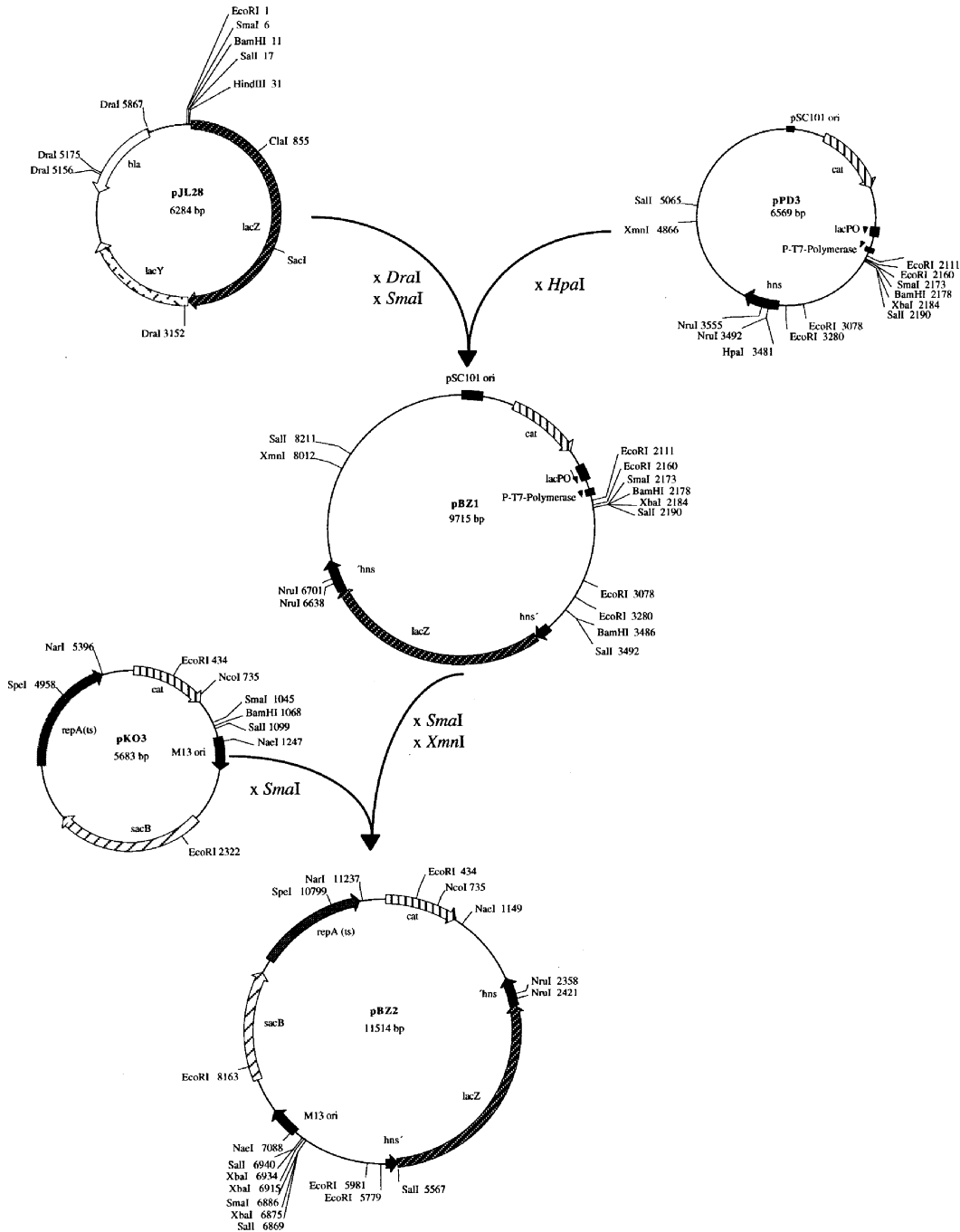


Abb. 2: Konstruktion der Plasmide pBZ1 und pBZ2

5.8 Konstruktion des *E. coli*-Stammes BZ 56 mit dem Integrationsplasmid pKO3

Die bisher hergestellten *hns-lacZ*-Fusionen (Dersch *et al.*, 1994) waren am *attB*-Lokus in das *E. coli*-Chromosom integriert. Ortspezifische Einflüsse auf die Regulation des *hns*-Gens sollten mit einer *hns-lacZ*-Fusion am authentischen Ort untersucht werden. Hierzu wurde das pKO3-Derivat pBZ2, welches das zu rekombinierende Fragment trägt, durch Elektroporation in den Stamm MC4100 transformiert. Zur Expression der Chloramphenicolresistenz wurde die Bakterienkultur 1h bei 30°C inkubiert, anschließend auf 42°C vorgewärmte LB-X-Gal-Platten mit Cml plattiert und bei 42°C inkubiert. Kolonien, die nach Wachstum bei 42°C auf Platten mit X-Gal und Cml blau waren, wurden in LB-Flüssigmedium ohne Antibiotika bei 42°C wachsen lassen. Nach dreimaligem Überimpfen, wurden Proben entnommen, eine Verdünnungsreihe hergestellt und adäquate Stufen ausplattiert, um eine möglichst große Anzahl an Einzelkolonien pro Platte zu testen. Diese Platte diente als Masterplatte für das Replikaplattieren auf LB-X-Gal- und LB-X-Gal-Cml-Platten. Diejenigen Kolonien, die auf LB-X-Gal-Cml-Platten Cml-Sensitivität zeigten und auf der anderen Platte weiterhin blau waren, wurden gepickt und durch Southern Blot-Hybridisierung geprüft.

Alternativ wurden Proben auf Bgl-Platten ausplattiert. Durch die Insertion des *lacZ*-Gens in die *HpaI*-Schnittstelle wird der gleiche Genotyp erzeugt, den die *hns206::bla*-Mutation vorweist. Bei erfolgreicher Rekombination sind die gesuchten Klone gelb (Bgl⁺).

Alle Stämme, deren Konstruktion nicht gesondert beschrieben wird, sind mittels P1_{vir}-vermittelter Transduktion (III.5.6) hergestellt.

5.9 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Mit der PCR (Polymerase Chain Reaction) wurden DNA-Fragmente des *hns*-Gens nach der Standardmethode (White, 1993) in einem Trioblock (Biometra, Göttingen) amplifiziert. Als Standardbedingungen wurden 0,1-0,5 µg chromosomale DNA oder 0,001-0,005 µg Plasmid-DNA in einem 50 µl Ansatz mit je 10 pmol Primer (Tab. 5), 0,2 mM dNTP's, 1,5 mM MgCl₂ und 1,25 Units *Taq*-Polymerase in 1 x *Taq*-Polymerase-Puffer (Amersham) eingesetzt. Das angewendete Standardprotokoll für die PCR-Reaktion lautet: 3 min 94°C; 30 Zyklen (1 min 94°C; 1 min 60°C; je kb des zu amplifizierenden Fragments 1 min 72°C) und 5 min 72°C.

Tab.5 Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz(5`→3`)	IRD41
Hns1	AGGTC <u>GGTACCT</u> AACACCCTTGGCACGG ¹	
Hns2	ACACAG <u>AGCTCT</u> CAACAAACCACCCC ²	
Hns3	GCGGATCCTACCTGACGC	+
Hns4	CGCGCTACTGCCGCCAGG	+
<i>lacZ</i> -40	GTTTTCCCAGTCACGAC	+
CKO3	GAGGATCCGGTCCGCGGCCGC	+

¹ Hns1 führt eine *KpnI*-Schnittstelle ein. ² Hns2 führt eine *SacI*-Schnittstelle ein.

Die Nukleotide der Schnittstellen sind unterstrichen.

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden bei MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

5.10 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung aller PCR-klonierten Fragmente wurde der „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit“ mit 7-Deaza-dGTP (Amersham) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977). Dazu wurden Primer verwendet (Tab. 5), die an ihrem 5`-Ende mit einem Infrarotfarbstoff gekennzeichnet waren (IRD-41, MWG, Ebersberg). Die Gele wurden nach Angaben des Herstellers (Biozym) aus Sequagel XR ultra pure und Sequagel complete ultra pure hergestellt. Durch Die Reaktionsprodukte wurden auf einem LI-COR DNA-Sequencer (Modell 4000, MWG) und Software von MWG analysiert.

5.11 Computergestützte DNA-Analysen

Sequenzanalysen erfolgten mit den Lasergene Programmen (DNA Star Ltd., London, UK) und mit dem Programm DNA Strider (CEA, Frankreich). Die Datenbankvergleiche mit bekannten *hns*-Sequenzen und die Suche nach Homologen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) mit den Datenbanken des National Center for Biotechnology Informations (NCBI) und des European Molecular Biology Laboratories (EMBL) und mit den Datenbanken, die über das World Wide Web zur Verfügung gestellt werden (www.ncbi.nlm.nih.gov), durchgeführt.

5.12 DNA-Retardationsexperiment

In Gel-Shift-Analysen wurde untersucht, ob gereinigtes H-NS und H-NS* an bestimmte DNA-Fragmente bindet. Dazu wurden DNA-Fragmente mit den gereinigten Proteinen inkubiert und die gebildeten DNA-Proteinkomplexe auf einem Agarosegel von ungebundenen DNA-Fragmenten

getrennt. Hierbei nutzt man, daß Protein-DNA-Komplexe mit geringerer Geschwindigkeit im Gel wandern als freie, ungebundene DNA. Die Bindungsstudien wurden nach der Methode von Fried und Crothers (1981) durchgeführt und nach Lucht *et al.* (1994) modifiziert.

Die Bindung der Proteine an die geschnittene DNA erfolgte in 20 µl Reaktionsansätzen in Band-shift-Puffer (10 mM Tris-HCl pH7,5; 1 mM EDTA; 5 mM DTT; 5 % Glycerin; 80 mM NaCl) mit aufsteigenden Mengen an gereinigtem Protein (0-1 µg) und 1 µg geschnittenem Plasmid. Die Reaktionsansätze wurden 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf ein 1 % Agarosegel ohne Zugabe von Farbmarkern aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 0,5 % Tris-Borat-EDTA-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA-Fragmente wurden durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht und dokumentiert.

Um unterschiedliche Bindungsaffinitäten der verschiedenen H-NS-Proteine und StpA zu studieren, wurden Plasmide mit verschiedenen Promotorsequenzen, an die H-NS bindet, verwendet: das Plasmid pOS7 mit der *proU*-Promotorregion, das Plasmid pKS4 mit dem regulatorischen Bereich von *hns* und dem *hns*-Strukturgen und das Plasmid pSK3 mit dem *stpA*-Promotor. Jedes der drei Plasmide wurde entsprechend mit Restriktionsenzymen geschnitten, so daß ein den gesamten Promotor umfassendes Fragment entsteht und jeweils mit gereinigtem H-NS bzw. H-NS* inkubiert. Das Plasmid pOS7 wurde mit *Bgl*I geschnitten, das Plasmid pKS4 mit *Hind*III und *Hinc*I verdaut und das Plasmid pSK3 mit *Nru*I geschnitten.

6 Biochemische Methoden

6.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Protein-Assay-Kit II (BioRad, München) nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Die Methode basiert darauf, daß CoomassieTM Brilliant Blue G250 gleichermaßen an saure und basische Aminosäurereste bindet, wobei das Absorptionsmaximum des Farbstoffes sich von 465 auf 595 nm verschiebt. Es wurden geeignete Verdünnungen der Proben gewählt und diese 10 min mit dem Farbstoffreagenz inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei 595 nm bestimmt. Als Referenz diente BSA, welches in bekannten Konzentrationen von 1 bis 15 µg eingesetzt wurde. Anhand der erstellten Eichkurve wurde die entsprechende Proteinkonzentration abgeschätzt.

6.2 Ganzzellextrakte

Von Übernacht- oder Überexpressionkulturen wurde die OD₅₇₈ bestimmt und ca. 1-1,5 ml Kultur abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1x SDS-Probenpuffer (60 mM Tris pH 6,8; 10 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 0,001 % Bromphenolblau) aufgenommen. Die Puffermenge ergibt sich aus der zuvor gemessenen OD₅₇₈, die der Zelldichte als Näherungswert entspricht. Das Pellet wurde resuspendiert und 7-10 min. bei 95°C denaturiert. Um die DNA-bindenden Proteine voll-

ständig von chromosomaler DNA zu befreien, wurde 1 µl BenzonaseTM (Merck, Darmstadt) zugegeben und die Proben zunächst auf einem Schüttelbrett 30 min intensiv geschüttelt, anschließend eine weitere Stunde unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert.

6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zum Auftrennen von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode nach Laemmli (1970) angewendet. Auf ein Minigel (6 x 8 x 0,1 cm) wurden etwa 50 µg Protein aufgetragen. Als Größenstandard zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde der Dalton-Marker VII-L für SDS-Gelelektrophorese der Firma Sigma (14-70 kDa) benutzt. Die Laufzeit der Trennung betrug 1 h bei 30 mA. Anschliessend wurden die Gele in ComassieTM Brilliant Blue G250 Lösung (Merck, Darmstadt) gefärbt und mit einer Lösung aus Methanol:H₂O:Essigsäure im Verhältnis 45:45:10 entfärbt.

6.4 Zweidimensionale Polyacrylamidelektrophorese

Die zweidimensionale Auftrennung von Ganzzellextrakt erfolgte nach der Methode, die von Klose (1975) und O'Farrell (1975) entwickelt und durch U. Völker (MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) optimiert wurde.

6.4.1 Probenvorbereitung

250 ml LB-Kulturen wurden bis zur gewünschten OD₅₇₈ angezogen. Die Zellen wurden geerntet und in 2-3 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) mit PMSF resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte wie unter 6.7.1 beschrieben. Die Gesamtkonzentration an Protein wurde durch die Bradford-Methode (1976) bestimmt.

6.4.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)- die erste Dimension

In der ersten Dimension (Isoelektrische Fokussierung) wurden Proteine entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt (pI), d.h. ihrer Ladung aufgetrennt. Dazu wurden Gele verwendet, die über einen immobilisierten pH-Gradienten verfügen (IPG-Gele). Sowohl mit kommerziellen Gelen der pH-Spanne pH 4-7 (Amersham Pharmacia Biotech) und mit selbsthergestellten IPG-Gelen pH 4-8 wurden Proteine aufgetrennt. Für die Herstellung der IPG-Gele wurde eine Gelkassette der Größe 20 x 26 cm verwendet, bevor die Cassette zusammengesetzt wurde, wurde ein Gelbond-Film an eine der beiden Glasplatten geheftet. An diesen Film polymerisiert das IPG-Gel und wird dadurch stabilisiert. Die saure und basische Lösung wurden nach Anleitung von Amersham Pharmacia Biotech aus Immobilen mit unterschiedlichem pK-Wert hergestellt, aus denen sich durch Variation der Volumina alle pH-Gradienten erzeugen lassen. Damit die Lösungen polymerisieren, wurden sie auf pH 7 eingestellt. Um die saure und basische Lösung kon-

tinuierlich miteinander zu mischen wurde ein Gradientenmischer (BioRad, München) und für das gleichmäßige Befüllen der vorgekühlten Gelkassette eine Peristaltikpumpe genutzt. Nur die saure Lösung enthält 87% Glycerin, wodurch sie schwerer wird, damit sich ein Gradient bilden kann. Über Nacht ließ man das Gel aushärten, anschließend wurde es mit destilliertem Wasser gewaschen, 30 min mit 2% Glycerin inkubiert und staubfrei getrocknet. Abgedeckt mit einer Schutzfolie, wird das Gel in 3-3,5 mm breite Streifen geschnitten.

Für spätere Anfärbung der analytischen Gele mit Coomassie wurden 300-400 µg Protein pro Gel aufgetragen. Die klare Proteinlösung wurde zu 300 µl Rehydratisierungspuffer (1 M Thioharnstoff, 8 M Harnstoff, 32,5 mM CHAPS, 28,3 mM DTT und 30 % Pharmalyte 3-10) in Acrylbrettern gefüllt, der IPG-Gel-Streifen mit der Gelseite nach unten eingelegt und mit Öl überschichtet. Nach 24 h Einrehydratisieren können die Gelstreifen kurz abgespült, in die MultiphorII-Aparatur (Amersham Pharmacia Biotech) plaziert werden und nach Anleitung des Herstellers fokussiert werden. Die Gelstreifen können bei -20 °C zwischen gelagert werden.

6.4.3 SDS-PAGE- die zweite Dimension

In der zweiten Dimension werden die Proteine nach ihrer Größe in 12,5% Polyacrylamidgelen aufgetrennt analog herkömmlichen SDS-Gelen. Auf die Trennung werden die IPG-Streifen durch Äquilibrieren vorbereitet, jeweils 15 min in Lösung A und B (50 mM 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 6 M Harnstoff; 30 % Glycerin; 4 % SDS und 23 mM DTT bzw. 0,24 M Iodoacetamid) bei RT inkubiert. Die Streifen wurden in die SDS-Gele mittels flüssiger 1 % Agarose gelöst in Sammelgelpuffer eingebettet und die Elektrophorese bei 10°C bei konstanter Leistung von 2-3 W über ca. 20 h durchgeführt (ESA, Maryland, USA). Im Anschluß wurden die Gele mit Coomasieblau gefärbt.

6.5 β-Galaktosidase-Enzymtest

Die *proU-lacZ*-Stämme ermöglichten die Untersuchung der H-NS abhängigen Regulation dieses Operons. Die Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität erfolgte nach Miller (1992). Hierzu wurden 100 bzw. 200 µl Zellen mit 2 Tropfen Chloroform und 1 Tropfen 0,1 % SDS permeabilisiert und nach 5-minütiger Lyse bei Raumtemperatur auf 2 ml mit Z-Puffer (Miller, 1992) aufgefüllt. Durch Zugabe von 0,4 ml ONPG (4 mg/ml) wurde die Reaktion gestartet und nach Gelbfärbung mit 1 ml Natriumcarbonat gestoppt. Die Extinktion der Gelbfärbung wurde photometrisch nach Abzentrifugieren der Zellreste bei 420 nm bestimmt. Als Referenz diente ein Testansatz, dem keine Zellen, nur das Wachstumsmedium zugegeben wurde. Die Berechnung der spezifischen enzymatischen β-Galaktosidaseaktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$A(\beta\text{-Gal}) = \frac{OD_{420} \times 6,75 \mu\text{mol}}{OD_{600} \times V \times t}$$

Die spezifische Aktivität der β -Galaktosidase $A(\beta\text{-Gal})$ gibt die Menge des in μmol gespaltenes Substrat (ONPG) pro min und mg Protein ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) an. In die Gleichung geht der Absorptionskoeffizient von $e = 4700\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ für bei 420 nm gespaltenes ONPG über den Faktor 6,75 ein.

OD_{420}	=	Optische Dichte bei 420 nm von β -Galaktosidase-Messungen
OD_{600}	=	Optische Dichte bei 600 nm der Zellsuspension, OD von 1 entspricht einer Proteinkonzentration von 107 $\mu\text{g/ml}$ (Miller, 1992)
V	=	Volumen der eingesetzten Zellsuspension in ml
t	=	Zeit der Enzymreaktion in min

Alle in dieser Arbeit angegebenen Enzymaktivitäten sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen. Die entsprechenden Kontrollstämme wurden immer gleichzeitig mit den zu untersuchenden Stämmen gemessen.

6.6 Überproduktion von H-NS und H-NS224 mit dem T7 Φ 10-Promotor/T7-RNA-Polymerase-System

Die Überexpression von H-NS und H-NS* unter der Kontrolle des T7 Φ 10-Promotors (Dersch *et al.*, 1994) erfolgte nach der Methode von Tabor und Richardson (1985) und Studier und Moffatt (1990). Hierbei werden Stämme verwendet, die eine chromosomale Kopie des Strukturgens für die T7 RNA Polymerase unter der Kontrolle der regulatorischen Sequenzen von *lacPO* tragen. Die T7 RNA Polymerase läßt sich über die regulatorischen Sequenzen durch Zugabe von IPTG in das Medium induzieren. Die Produktion von H-NS erfolgte im Stamm BL21. Die Überexpression von H-NS-224 wurde im Stamm GF3, der die *hns206*-Mutation trägt, durchgeführt. Übernachtskulturen mit den Expressionsplasmiden pPD3 und pALP1 wurden in M9-Medium mit 10 mM CaCl_2 , 0,4 % Glucose; 0,5 % Casaminoäuren (Difco, Augsburg), 1 mM MgSO_2 und 25 $\mu\text{l/ml}$ Cml angezogen, 1:100 im gleichen Medium verdünnt und bis zu einer OD_{578} von 0,5 wachsen gelassen. Der exponentiell wachsenden Kultur wurde IPTG in einer Endkonzentration von 2,5 mM zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Unter Zugabe von Rifampicin (Merck, Darmstadt) in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ wurde die Kultur für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Rifampicin hemmt die bakterielle DNA-abhängige RNA-Polymerase, was zu einer Hemmung der Transkription aller bakteriellen Gene führt, nur die T7-RNA-Polymerase bleibt von Rifampicin unbeeinflusst, so daß nur das Gen unter Einfluß des T7-Promotors exprimiert wird. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 9.500 x g geerntet. Zur Überprüfung der Überexpression wurden die Zellen in 1/10 des Ausgangsvolumen in Probenpuffer resuspendiert und nach 5-minütigem Kochen auf ein 15 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

6.7 Reinigung von H-NS und H-NS*

6.7.1 Reinigung von H-NS

Die Reinigung von H-NS erfolgte nach der Methode von P. Dersch (1993). Hierzu wurden insgesamt 2 x 5 l Zellkultur des Stammes BL21 mit dem Expressionsplasmid pPD3 angezogen. Die Induktion der *hns* Expression erfolgte wie unter III.6.3 beschrieben.

Nach der Überexpression wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 9.500 x g (6000 rpm, Sorvall, Du Pont) geerntet und in 1/100 des Ausgangsvolumens in Puffer A (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 5 mM DTT) aufgenommen. Die Bakterienzellen wurden mit einer „French-Press“ in 3 Durchgängen (Druck der French-Press-Kammer 10⁵ kPa) aufgeschlossen und anschließend mit 15.000 rpm (27.000 x g) zentrifugiert, um intakt gebliebene Zellen und Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde danach in der Ultrazentrifuge bei 40.000 rpm (100.000 x g, Beckmann, L7-65, Rotor Ti-75) 1 h, bei 4°C abzentrifugiert, um größere Zellbestandteile und Membranbestandteile aus dem Zellextrakt zu entfernen. Zu dem klaren Zellysatz wurde gesättigtes Ammoniumsulfat in einer Endkonzentration von 40 % langsam unter Rühren auf Eis zugetropft und die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation bei 15.000 rpm abgetrennt und verworfen. Die gewonnene Proteinlösung wurde über Nacht in 5 l Dialysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT) dialysiert und die klare Lösung auf eine HiTrap[®]-Heparinsäule (Amersham Pharmacia Biotech, Säulenvolumen: 5 ml) aufgetragen, die zuvor mit Puffer A (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 5 mM DTT) äquilibriert wurde. Der Auftrag erfolgte mit 100 mM NaCl aus Mischung von Puffer A und Puffer B (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 5 mM DTT, 1 M NaCl). Nach dem Auftrag wurde die Säule mit 6 Säulenvolumen mit 100 mM NaCl und mit 6 Säulenvolumen mit 200 mM NaCl bei einer Flußrate von 1 ml/min gewaschen. Anschließend wurde H-NS durch Anlegen eines linearen Gradienten von 250 mM- 1 M NaCl in Puffer A eluiert. Entsprechende Fraktionen wurden dialysiert und durch Affinitätschromatographie mit einer DNA-Cellulose-Säule (native, doppelsträngige DNA-Cellulose, 1 x 10 cm, Amersham Pharmacia Biotech) mit einer Flußrate von 0,2 ml/min aufgetragen. Auftrag und Waschschrte erfolgten wie für die Heparinsäule nur mit der Flußrate von 0,2 ml/min. In einem Einstufenschritt mit 500 mM NaCl in Puffer A wird H-NS von der Säule eluiert. Die gesamten Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

6.7.2 Reinigung von H-NS224

Zur Gewinnung von Zellextrakt für die Reinigung von H-NS-224 wurde GF3 mit dem Expressionsplasmid pALP1 angezogen. Die Induktion der *hns* Expression erfolgte wie unter III.6.3 beschrieben. Die Probenaufbereitung bis zum Auftrag auf die DNA-Cellulose-Säule wurden wie in III.6.7.1 beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, daß die Ammoniumsulfatfällung nur mit einer 30%-igen Sättigung durchgeführt wurde und die Volumina der Waschschrte der ersten Reinigung etwas verringert wurden. Auf die DNA-Cellulose-Säule wurde mit 80 mM NaCl

aufgetragen, gewaschen wurde mit 2 Säulenvolumina 100 mM NaCl und 2 Säulenvolumina 200 mM NaCl und eluiert mit Zweistufen bei 400 mM NaCl und 700 mM NaCl.

6.7.3 Reinigung von H-NS208, H-NS210, H-NS229 und H-NS230

Die Proteinen H-NS208, H-NS210, H-NS229 und H-NS230 wurden jeweils in großen Zuchtansätzen in 2 x 5 l DYT gezogen. Die Probenaufbereitung wurde wie unter III.6.7.2 beschrieben durchgeführt. Das Dialysat der Ammoniumsulfatfällung wurde direkt mit 80 mM NaCl auf die DNA-Cellulose aufgetragen, mit 100 mM und 200 mM NaCl gewaschen und mit einem linearen Gradienten 200 mM -700 mM eluiert. Die Proteinkonzentration der jeweiligen H-NS-Proteine in den einzelnen Fraktionen wurde nach Bradford (Bradford, 1976) analysiert. Die Reinheit der Proteine wurde über SDS-Gelelektrophorese kontrolliert.

6.8 Reinigung von StpA

Die Heparinsäule (HiTrap[®], 5 ml) wurde mit Puffer A äquilibriert und die vorbereitete Proteinlösung aufgetragen. Der Auftrag der Proteinlösung erfolgte mit 30 ml 100 mM NaCl, anschließend wurde die Säule mit 40 ml 100 mM NaCl und 30 ml 500 mM NaCl mit einer Flußrate von 1 ml/min gewaschen. Mit einem Einstufenschritt durch Waschen mit 40 ml 700 mM NaCl wurde das Protein von der Säule eluiert und in 3 ml fraktioniert gesammelt. Über Nacht wurden diejenigen Fraktionen mit der höchsten Konzentration an gereinigtem StpA-Protein gegen 5 l Puffer A dialysiert.

Für den zweiten Reinigungsschritt wurde wie zuvor schon für H-NS eine DNA-Cellulose-Säule verwendet. Die Probe wurde mit 20 ml 100 mM NaCl auf die zuvor mit Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 30 ml 350 mM NaCl mit einer Flußrate von 0,2 ml/min gewaschen, die Elution von StpA von der DNA-Cellulose-Säule erfolgte, wie die Elution von der Heparinsäule, in einem Einstufenschritt mit einer Salzkonzentration von 600 mM NaCl.

6.9 Immunologischer Nachweis von H-NS und H-NS-Derivaten

Um H-NS und HNS* immunologisch nachzuweisen, wurden die in einem 15 %-igen SDS-Gel aufgetrennten Proteine nach der Methode von Towbin (1979) elektrophoretisch (1 h, 100 V) auf eine Immobilon-P, 0,45 µm Membran (Millipore) übertragen. Der Transfer erfolgte bei 0,2 mA und wurde nach 1 h beendet. Für die immunologische Reaktion der H-NS-Proteine wurden polyclonale H-NS-Antikörper verwendet, die aus Kaninchen stammen, die mit gereinigtem, nativem H-NS immunisiert wurden (Dersch *et al.*, 1993). Die Membran wurde zuvor mit 5 % Milchpulver in TBST (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 5 % Tween) abgesättigt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers gering zu halten. Nach dem Abblocken wird im selben Puffer mit dem H-NS-spezifischen Antiserum in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wurde mit einem sekundären Antikörper, einem Ziegen-Anti-Kaninchen alkalischen Phosphatase-Konjugat (Sigma, Deisenhofen) gebunden und anschließend farblich

mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid (NBT) in AP-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂) nachgewiesen. Alternativ wurde das ECF-Vista-Substrat "AttoPhos" (Amersham Pharmacia Biotech) für das Visibilisieren verwendet. Hierzu wurde die Membran kurz in AP-Puffer gewaschen, die Membran mit dem Substrat benetzt (12 µl/cm³) und sofort auf die Glasplatte des Fluorimagers MD STORM 860 gelegt. Das Scannen der Blots erfolgte im Modus „blue chemifluorescence“ bei einer Auflösung von 100 µm. Die Auswertung wurde mit dem Programm Image Quant durchgeführt.

IV Ergebnisse

1 Einfluß von *hns* auf verschiedene physiologische Funktionen

Mutationen im *hns* Gen besitzen *hns* einen hoch pleiotropen Phänotyp. Der Einfluß des Insertions-allel *hns206*, bei dem eine Ampicillin-Cassette in eine *HpaI*-Schnittstelle inseriert wurde, so daß nur die ersten 19 Aminosäuren des Proteins synthetisiert werden, und das Allel *hns205*, bei dem nur die ersten 37 Aminosäuren des Proteins aufgrund einer Unterbrechung des Gens durch ein *Tn10* synthetisiert werden, konnten deutliche Einflüsse auf unterschiedliche physiologischen Prozesse nachgewiesen werden (Dersch, 1995). Im folgenden wird dargestellt, wie die Wirkung der Punktmutation sich auf die physiologische Aufgabe von *hns* auswirkt. Im einzelnen wird die Wirkung der verschiedenen *hns*-Punktmutanten (Abb. 3, Tab. 6) auf die Expression der Operons *proU* und *bgl* und die Auswirkung auf die Transposition studiert.

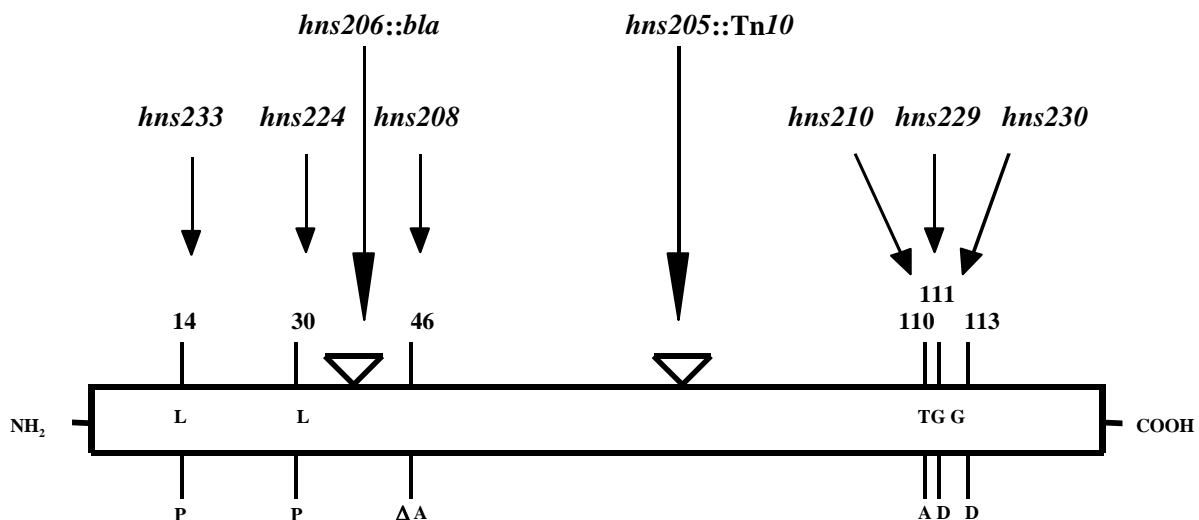


Abb. 3: Übersicht der *hns*-Punktmutanten und *hns*-Insertionsmutanten

Die mit dem Pfeil indizierten Punktmutanten sind eine Auswahl der in der AG Bremer von J. Lucht und A. Perraud isolierten Mutanten, die in dieser Arbeit untersucht wurden. *hns233* ist im Rahmen dieser Arbeit entstanden. Auch die Insertionsmutationen von P. Dersch *hns206::bla*, die ein 37 Aminosäuren langes H-NS-Fragment und *hns205::Tn10*, die ein 94 Aminosäure langes H-NS-Protein kodiert, sind eingetragen.

Tab. 6: Die in dieser Arbeit verwendeten *hns*-Punktmutanten

Angegeben ist jeweils die Lokalisation des Aminosäureaustauschs und die Bezeichnung des Stamms bzw. das pPD100-Derivat, das in dieser Arbeit erstellt wurde.

Allel	Aminosäureaustausch bzw. Deletion	Stamm	pPD100-Derivat
<i>hns233</i>	L14P		pBZ13
<i>hns224</i>	L30P		pALP1
<i>hns208</i>	Δ A47	JML7	pBZ9
<i>hns210</i>	T110A	JML10	pBZ10
<i>hns229</i>	G111D	ALP3	pBZ11
<i>hns230</i>	G113D	ALP4	pBZ12

1.1 Einfluß auf die Expression von *proU* und *bgl*

Die Wirkung von *hns* auf das *proU* und das *bgl* Operon ist bereits belegt. Untersucht werden sollte, inwieweit die in unserer Arbeitsgruppe von J. Lucht und A. Perraud isolierten Punktmutanten eine Wirkung auf die Regulation der beiden Operons haben, die zu den am besten untersuchten *hns*-sensitiven Systemen gehören.

Das *proU* Operon kodiert ein Bindeprotein abhängiges Transportsystem, das für die aktive Aufnahme von Glycin Betain und Prolin Betain zuständig ist (May *et al.*, 1986; Gowrishankar, 1989). Die Transkription ist osmoreguliert, von einem geringen Basislevel wird durch einen osmotischen Schock ein starker plötzlicher Anstieg der Expression erreicht, wobei der Anstieg der Expression zur außerhalb der Zelle vorliegenden Osmolarität proportional ist (Gowrishankar, 1985; Barron *et al.*, 1986; Csonka & Hanson, 1991; zur Übersicht: Gowrishankar & Manna, 1996).

Das *bgl* Operon ist das am besten untersuchte kryptische Operon. Unter normalen Bedingungen wird es nicht exprimiert. Es enthält die komplett funktionstüchtigen Strukturgene, die für die Aufnahme und Verwertung von β -Glucosiden wie Salicin und Arbutin benötigt werden (Schnetz *et al.*, 1987). Beiden Operons werden von *hns* reprimiert und Mutationen, die zum Ausfall von *hns* führen zu einer Derepression von *proU* und *bgl*. Um die Funktionsweise von H-NS in den unterschiedlichen Transkriptionssystemen zu testen, wurden verschiedenen Punktmutanten auf ihr Expressionsverhalten hin untersucht.

Für die Untersuchung der *proU* Expression wurden die Stämme mit den entsprechenden *hns*-Allele in LB mit der entsprechenden Menge an NaCl anwachsen lassen, in der stationären Phase geerntet, und anschließend die OD₆₀₀ von der Kultur und die OD₄₂₀ von dem Enzymassay bestimmt und daraus die β -Galaktosidaseaktivität errechnet.

In Abwesenheit von Salz (Abb. 4) sind die Aktivitäten nur sehr gering, jedoch ausreichend um auf MacConkey-Platten mit Lactose eine deutlich rote Farbe zu ergeben. Dieses Verhalten wurde für den Screen der Mutanten auf der Basis des Farbumschlags auf Laktose-MacConkey-Platten verwendet. Schon bei geringer Osmolarität zeigten die *hns* Mutanten eine deutliche Expression der $\Phi(\textit{proU-lacZ})\textit{hyb2}$ Fusion, als ob sie einer wesentlich höheren Osmolarität ausgesetzt wären

(Lucht & Bremer, 1994). Wie in dem Experiment deutlich wird, führt 100 mM NaCl zu einer zu einer deutlichen Steigerung der Expression, der auch auf Laktose-MacConkey-Platten sichtbar wird, sich aber mittels der Indikatorplatten nicht quantifizieren läßt. Die Expression von *proU* im Stamm BZ28 (*hns206*) wird um das vierfache erhöht, die meisten Punktmutanten erreichen geringere Steigerungen, nur die Expression von *proU* in ALP3 ist ähnlich erhöht wie bei dem Allel *hns206::bla* (Abb. 4, Stamm BZ28), das als Referenz dient. Die Regulation dieses Allels scheint wie in dem Insertionsallel *hns206::bla* nicht mehr zu funktionieren. Bei induzierenden Bedingungen von 100 mM Salz sind die Punktmutanten außerdem in unterschiedlichem Maß in der Lage, die *proU-lacZ* Fusion zu reprimieren. Daraus ist zu schließen, daß die Fähigkeit *proU* zu reprimieren noch teilweise erhalten ist. Die Expression von *proU-lacZ* wird in JML7 am stärksten reprimiert wird, in den Stämmen JML10 und ALP4 ist die Fähigkeit *proU-lacZ* zu reprimieren etwas weniger ausgeprägt.

Daß die Aminosäure entscheidend ist, die von der Mutation betroffen ist, wird dadurch ersichtlich, daß die Stämme JML10, ALP3 und ALP4 unterschiedliche Aktivitätswerte haben. Aufgrund der räumlichen Nähe AS 110, AS 111 und AS 113 der Allele *hns210* (JML10), *hns229* (ALP3) und *hns230* (ALP4) innerhalb des Protein hätte man gleiches Verhalten erwarten können.

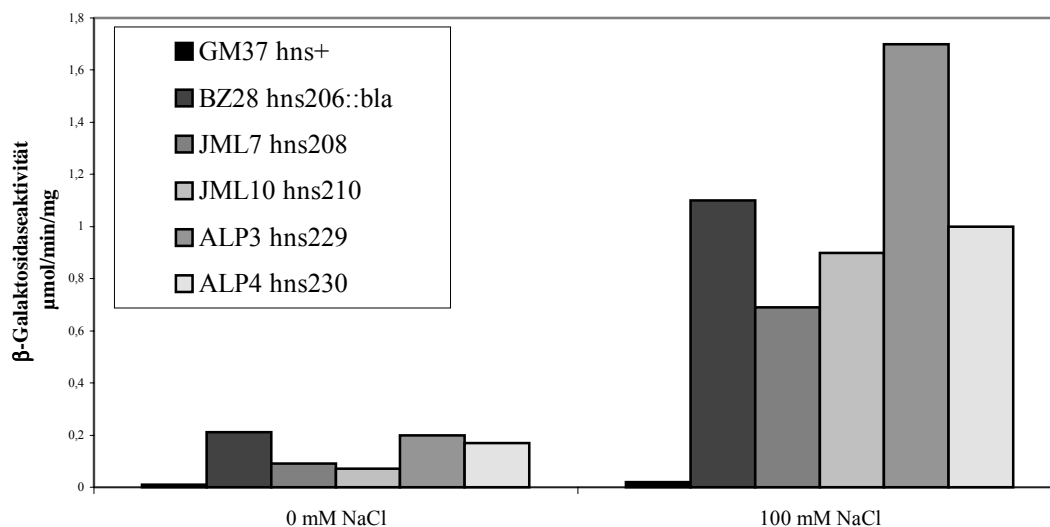


Abb. 4: Allelspezifischer Phänotyp der auf dem Chromosom lokalisierten Punktmutanten

Der Stamm GM37 trägt chromosomal das Wildtypallel *hns*⁺, der Stamm BZ28 das *hns206::bla* Allel. Die Stämme JML7, JML10, ALP3 und ALP4 weisen jeweils eine Punktmutation im *hns*-Strukturgen auf (siehe Tab. 6). Die Aktivität der $\Phi(\textit{proU-lacZ})\textit{hyb2}$ Fusion wurde in den genannten Stämmen ohne und mit 100 mM NaCl in LB-Medium bestimmt. Die OD₅₇₈ betrug jeweils zwischen 2,5 und 3, die β -Galaktosidaseaktivität ergibt sich aus Dreifachbestimmung.

Die Expression des *bgl* Operons wurde mittels eines Plattentests untersucht (Tab. 7). Wenn das Operon aktiv ist, werden in Festmedien angebotene β -Glucoside unter Säurebildung gespalten. Die Bildung von Säure wird durch den Farbumschlag des Indikators von blau nach gelb angezeigt und

ist gleichbedeutend mit dem Anschalten des kryptischen Operons. Kolonien von Stämmen mit intaktem H-NS sind demnach weiterhin blau und zeigen einen Bgl⁻-Phänotyp.

Tab. 7: Einfluß der chromosomalen Punktmutanten auf die Expression von *bgl*

Die Beurteilung der Expression erfolgt aufgrund der Gelbfärbung der Indikatorplatten. Gelbfärbung bedeutet Abbau von Salicin durch die Enzyme des *bgl*-Operons.

Stamm	Allel	Aminosäureaustausch bzw. Deletion	<i>bgl</i> Phänotyp
GM37	<i>hns</i> ⁺		Bgl ⁻
BZ28	<i>hns206::bla</i>		Bgl ⁺
JML7	<i>hns208</i>	ΔA47	Bgl ⁺
JML10	<i>hns210</i>	T110A	Bgl ⁻
ALP3	<i>hns229</i>	G111D	Bgl ⁻
ALP4	<i>hns230</i>	G113D	Bgl ⁻

Auch in der Ausprägung des Bgl-Phänotyps unterscheiden sich die Allele, wie bereits für die Allele *hns206* und *hns205* beschrieben (Dersch *et al.*, 1994), ist sie allelspezifisch. Das Allel *hns208* zeigt einen klaren Bgl-Phänotyp wie auch der Kontrollstamm BZ28, die Farbe der Kolonien auf dem Festmedium sind gelb. Bei den weiter am C-Terminus lokalisierten Aminosäureaustausche an Position 110, 111 und 113 sind wie der Wildtypstamm MC4100 die Kolonien farblos auf blauem Festmedium, sie sind in der Lage das *bgl*-Operon zu reprimieren.

Für eine weitere Punktmutation L30P ist analog zu den chromosomalen Mutanten auch die *proU-lacZ* Aktivität und der Bgl-Phänotyp bestimmt worden. Hier liegt im Gegensatz zu den bisherigen Stämmen das *hns*-Allel auf einem „low copy“- Plasmid vor und wird in *hns*⁺ und *hns* Hindergrund vermessen. Analog wurde mit dem leeren Vektor und dem Plasmid pPD3 mit dem Wildtypallel als Kontrollen verfahren.

In Abwesenheit von Salz ist die β-Galaktosidaseaktivität nur von den Stämmen BZ28 *hns206::bla* (pPD100) und BZ28 *hns206::bla* (pALP1) deutlich meßbar (Abb. 5). In beiden Stämmen kommt es in Abwesenheit von H-NS zur Derepression, wobei der Effekt deutlicher in BZ28 (pALP1) ist. Das Allel *hns224* liefert ein vollständiges Genprodukt ist aber in Bezug auf die *proU*-Repression nicht voll funktionsfähig. In Anwesenheit von Salz verstärkt sich der Effekt und noch ein weiterer Effekt tritt auf, das es auch in dem *hns*⁺-Hindergrund in sich der Phänotyp des mutierten Allels *hns224* durchsetzt. Wenn sich ein Allel gegenüber dem Wildtypallel durchsetzt und damit der Verlust der Wildtyp-Phänotyps verbunden ist, spricht man von negativer Dominanz. Meist spielt dann auch eine Rolle, in welcher Dosis die einzelnen Genprodukte vorliegen, das durch das Plasmid kodierte Genprodukt überwiegt in der Menge und setzt sich gegen das Wildtypallel durch. Das Allel *hns224* zeigt einen ausgeprägten Bgl⁺-Phänotyp, sowohl in *hns*⁺- als auch in *hns*-Hindergrund.

Für die durch Ungenauigkeiten der Taq-Polymerase bei der PCR entstandene Mutante *hns233* L14P (siehe IV.3.1.1) sind analog die gleichen Experimente durchgeführt worden mit gleichem Resultat in beiden Expressionssystemen.

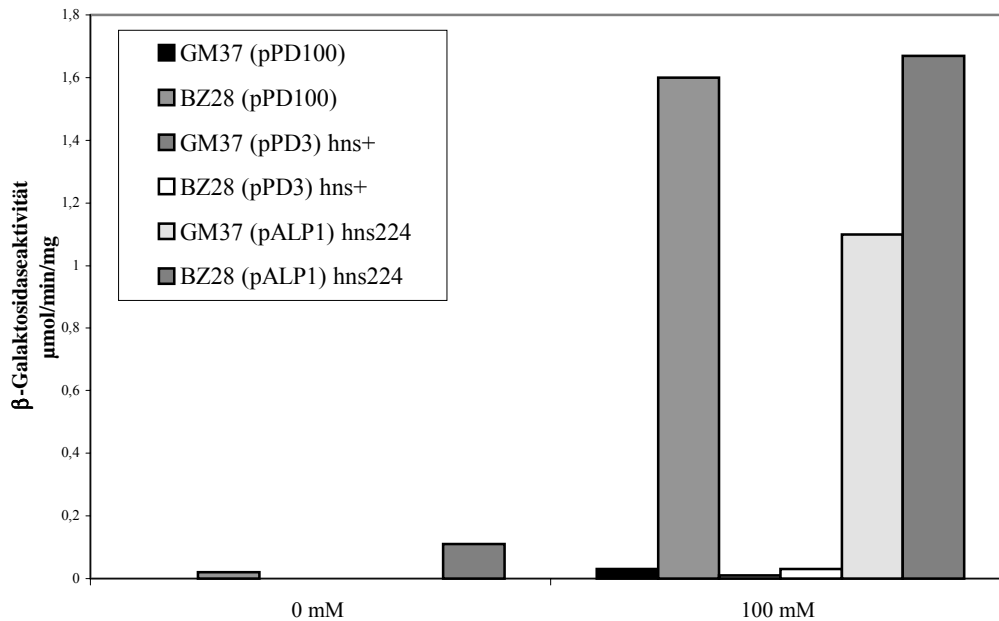


Abb. 5: Negative Dominanz der auf dem Plasmid pALP1 lokalisierten *hns*-Punktmutation *hns224*

Der Stamm GM37 trägt chromosomal das Wildtypallel *hns*⁺, der Stamm BZ28 das *hns206::bla* Allel. Die Aktivität der $\Phi(\textit{proU-lacZ})\textit{hyb2}$ Fusion wurde in den genannten Stämmen ohne und mit 100 mM NaCl in LB-Medium bestimmt. Die OD₅₇₈ betrug jeweils zwischen 2,5 und 3, die β -Galaktosidaseaktivität ergibt sich aus Dreifachbestimmung.

1.2 Einfluß auf die Excision von Tn10

Die Beteiligung von Nukleoid assoziierten an der Transposition von Tn10 wurde erstmals 1987 von Morisato und Kleckner (1987) in Analysen zur zum Teil gereinigter Transposase entdeckt. Wie bereits bekannt ist, schränkt H-NS das Springen von Transposons ein (Dersch, 1995). Mit den drei ausgewählten Punktmutanten sollte ergänzend nachgewiesen werden, ob sie auch in der Lage sind, die Transposonbewegung zu beschränken, oder ob die Punktmutation ähnlich wie *hns206* eine erhöhte Transpositionsfrequenz zeigen. Stämmen mit dem entsprechenden *hns*-Hintergrund, in denen das Gen *malF*, das das innere Membranprotein MalF des Maltosetransporters kodiert (Treptow & Shuman, 1985), durch ein Tn10 (Kleckner & Gottesman, 1991; Kleckner *et al.*, 1996) unterbrochen ist, sind nicht in der Lage, auf Minimalplatten mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Voraussetzung für diese Vorgehensweise ist das vollständige Herausschneiden des Transposons, was einer von drei möglichen Wegen ist, auf denen ein Tn10 ein Gen wieder verlassen kann und der einzige, der das Gen in seiner ursprünglichen Sequenz wiederherstellt (Foster *et al.*, 1981). Das Tn10, einem typischen Vertreter der zusammengesetzten Transposons,

ist aus zwei in zueinander entgegen gesetzt orientierten IS10-Elementen, wovon nur eines eine intakte Transposase kodiert, und einer Tetracyclinresistenz-Determinante aufgebaut, transponiert nach dem nicht-replikativen Mechanismus (Little & Mount, 1982; Walker, 1984). Es wurde nach Revertanten gesucht, die das Tn10 vollständig ausschneiden, und so wieder ein funktionsfähiges *malF* Gen erlangen, um Maltose in die Zelle zu transportieren. Nachgewiesen wurde dieses Reversionsereignis dadurch, daß die Revertanten auf Nährböden mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen konnten. Von den entsprechenden Stämmen wurden mehrere unabhängige Vorkulturen angeimpft und die Zellen bei einer OD₅₇₈ zwischen 0,7 und 1,0 geerntet. Nach dreimaligem Waschen mit MMA wurden Verdünnungsreihen erstellt und entsprechende Stufen auf Glucose/MMA-Platten zur Bestimmung der Gesamtzellzahl und auf Maltose/MMA zum Ermitteln der Anzahl der Revertanten ausplattiert. Aus dem Verhältnis der Anzahl an Revertanten zu der ermittelten Gesamtzellzahlen läßt sich die Excisionsfrequenz errechnen.

Für das RecA-Protein, das bei der homologen Rekombination und bei DNA-Reparaturereignissen eine zentrale Rolle spielt, war bisher bekannt, daß die präzise Excision von Tn10 in *Salmonella typhimurium* in *uvrD*-Mutanten oder nach UV-Bestrahlung bzw. Mitomycin C-Behandlung von RecA anhängig ist (Levy *et al.*, 1991), wenn die Excisionsreparatur empfindlich gestört ist. Um festzustellen, ob an den von H-NS beeinflussten Transpositionereignissen, RecA beteiligt ist, wurde in den Stämmen SK2 und SK5 durch P1_{vir}-vermittelten Transduktion ein *recA56::cat* anstelle des intakten *recA*-Gens eingeführt. Die erhaltenen Stämme sind UV-sensitiv, was durch UV-Bestrahlung überprüft wurde. Auch für diese Stämme wurde die Excisionsfrequenz bestimmt. Die Excisionsfrequenz der *hns206*-Stämme ist um 3 bis 4 Zehnerpotenzen höher als die des Wildtypstammes, das Tn10 wurde aus dem *malF* Gen entfernt, so daß sie Maltose in die Zelle aufnehmen konnten (Tab. 8).

Tab. 8: Einfluß von *recA* und verschiedenener *hns*-Punktmutanten (*hns210*, *hns229* und *hns230*) auf die Excisionsrate von Tn10

Stamm	Genotyp	Excisionsfrequenz				
		I	II	III	IV	V
SK2	<i>hns⁺ malF::Tn10</i>	5·10 ⁻⁸	2·10 ⁻⁸	1·10 ⁻⁸	2·10 ⁻⁸	6·10 ⁻⁸
SK5	<i>hns206 malF::Tn10</i>	3·10 ⁻³	1·10 ⁻³	5·10 ⁻⁴	6·10 ⁻⁴	8·10 ⁻⁴
BZ2	<i>hns⁺ malF::Tn10 recA56::cat</i>	1·10 ⁻⁸	3·10 ⁻⁸	2·10 ⁻⁸	4·10 ⁻⁸	2·10 ⁻⁸
BZ3	<i>hns206 malF::Tn10 recA56::cat</i>	3·10 ⁻³	2·10 ⁻³	2·10 ⁻³	1·10 ⁻³	1·10 ⁻³
BZ6	<i>hns210 malF::Tn10</i>	1·10 ⁻⁷	8·10 ⁻⁷	3·10 ⁻⁷	6·10 ⁻⁷	7·10 ⁻⁷
BZ7	<i>hns229 malF::Tn10</i>	4·10 ⁻⁷	7·10 ⁻⁷	7·10 ⁻⁷	6·10 ⁻⁷	3·10 ⁻⁷
BZ8	<i>hns230 malF::Tn10</i>	2·10 ⁻⁷	4·10 ⁻⁷	9·10 ⁻⁸	1·10 ⁻⁷	1·10 ⁻⁷

Nach der Ernte bei einer OD₅₇₈ zwischen 0,7 und 1,0 und Waschschritten wurden Verdünnungen hergestellt und auf Glucose/MMA- bzw. Maltose/MMA-Platten ausgestrichen. Über Nacht wurden die Platten inkubiert und die Kolonien ausgezählt. Die Excisionsfrequenz ist der Quotient von Anzahl der Revertanten und der Gesamtzellzahl.

Die Stämme mit den *hns*-Punktmutanten verhalten sich nicht anders als der Wildtyp, ein einzelner Aminosäureaustausch führt nicht zum Verlust der Fähigkeit, das Springen von Tn10 zu beschränken. Auch scheint das Ereignis, das zur Reversion führt, nicht von RecA abzuhängen, weil sich die Frequenzen von den *recA::cat*-Stämmen nicht von den *recA*-Wildtypstämmen SK2 und SK5 unterscheiden.

Durch Ausstreichen von Revertanten auf Tetracyclin-Platten wurde geprüft, ob die Reversion durch vollständiges Entfernen des Tn10 aus dem Chromosom oder durch Transposition an einen anderen Ort entstanden ist. Nur 15% bis 20% der getesteten Stämme sind weiterhin Tetracyclin resistent, die Mehrheit der Revertanten verliert das Transposon komplett. H-NS bewirkt hier nicht die erneute Insertion des springenden Elements Tn10, sondern fördert die Deletion.

1.3 Einfluß auf die Expression von *frd*

Das Operon *frdABCD*, das den Fumaratreduktase-Komplex (FRD) kodiert, wird in Abhängigkeit von Sauerstoff und verschiedener C-Quellen reguliert. Zu den bisherigen spezifischen Regulatoren dieses Komplexes gehören FNR (Fumarat-Nitratreduktase-Regulator), der die Induktion unter Abwesenheit von Sauerstoff vermittelt (Jones & Gunzalus, 1987) und NarL, ein Regulator, der in Anwesenheit von Nitrat und unter anaeroben Bedingungen FRD reprimiert (Iuchi & Lin, 1987). Auf transkriptioneller Ebene wird die Induktion durch Dicarboxylate über das Zweikomponentensystem DcuSR vermittelt (Zientz *et al.*, 1998), jedoch ist die Regulation der FRD dadurch nicht vollständig erklärt. So wurde H-NS als ein global wirkender Regulator, der vorwiegend Umwelt kontrollierte Gene reguliert, auf eine mögliche Beteiligung an der Regulation getestet. Durch P1_{vir}-vermittelten Transduktion wurde das *hns* Gen des Stammes MC4100λJ100 durch das Allel *hns205* ersetzt. Aufgrund der Ampicillinresistenz des Parentalstammes wurde das Allel *hns205* gewählt, das über eine Tetracyclinresistenz verfügt.

In einer statischen Kultur wurde der Parentalstamm MC4100λJ100 und die *hns*-Mutante IMW189 unter anaeroben Bedingungen mit Glucose plus Fumarat als Substrat wachsen lassen. Die Gefäße wurden vor und nach dem Animpfen evakuiert und mit Stickstoff begast, so daß sowohl im Nährmedium als auch in dem Luftraum über der Kultur kein Sauerstoff mehr vorhanden war. Unter diesen Bedingungen ist die FRD voll angeschaltet. Weil die Menge an H-NS in Abhängigkeit von Wachstumsphase schwankt und in der spät exponentiellen und stationären Phase am höchsten in der Zelle konzentriert ist (Dersch *et al.*, 1993), wurden über den gesamten Wachstumsverlauf Proben entnommen und die OD₅₇₈ und die Expression von *frdA-lacZ* über Messung der β-Galaktosidaseaktivität für beide Stämme bestimmt. Durch den Auftrag der OD₅₇₈ gegen die entsprechende β-Galaktosidaseaktivität wird der Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit umgangen, da der *hns205*-Stamm deutliche Wachstumsdefizite zeigt. Die Expression von *frdA-lacZ* stieg in beiden Stämmen in der früh exponentiellen Phase und erreichte die höchste Aktivität in der Mitte der exponentiellen Phase (Abb. 6). In der stationären Phase nahm die Expression langsam ab. Die Aktivität der Mutante war über den gesamten Wachstumsverlauf geringfügig

höher als die des Parentalstammes, der Unterschied war in der spät exponentiellen Phase am größten, jedoch nicht signifikant. H-NS hatte unter anaeroben Bedingungen keinen auffälligen Einfluß auf die Expression von *frdA-lacZ*., möglicherweise nur ein geringer reprimierender Einfluß.

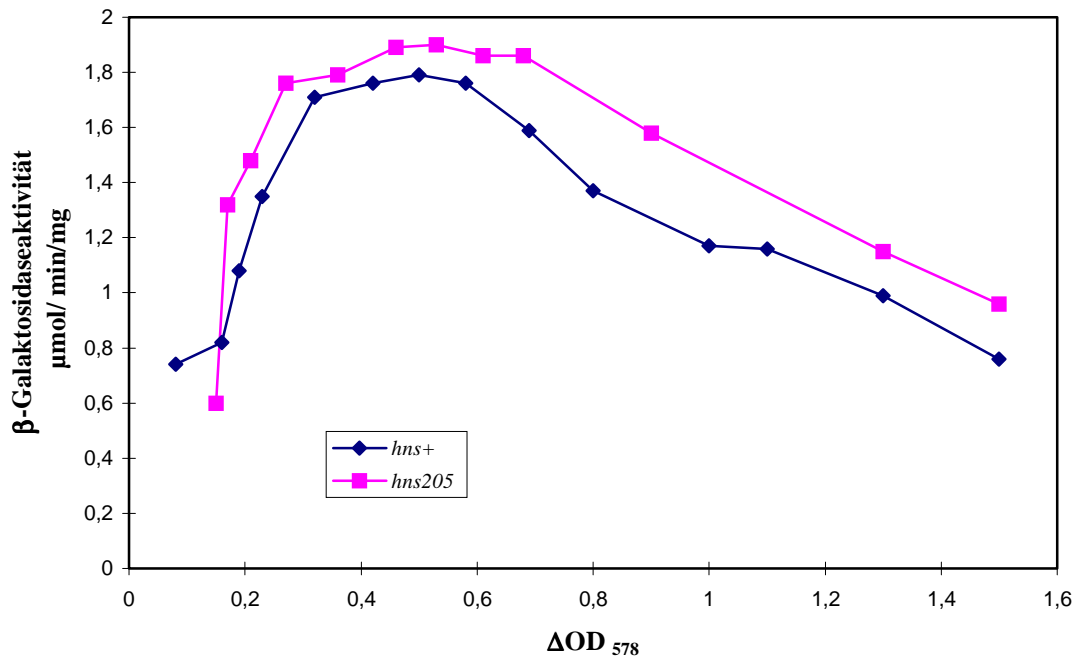


Abb. 6: Einfluß von *hns205* auf die Expression der *frdA-lacZ* Fusion in Abwesenheit von Sauerstoff

Die Zellen von MC4100 λ J100 (*hns*⁺) und IMW189 (*hns205*) wurden in MMA unter Zusatz von Glucose und Fumarat unter anaeroben Bedingungen gezogen. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität in Abhängigkeit zur Zelldichte.

Unter Aerobiose wurde Parentalstamm und Mutante mit Glucose, Fumarat bzw. Succinat als Kohlenstoffquelle gezüchtet und die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Es sollte untersucht werden, ob H-NS für die aerobe Induktion der *frdA-lacZ* Fusion durch verschiedene Kohlenstoffquellen beteiligt ist.

Bei Zucht mit Glucose (Abb. 7 A) unterscheidet sich in beiden Stämmen die Expression von *frdA-lacZ* nicht signifikant. Bei Zucht mit den Dicarboxylaten Fumarat und Succinat (Abb. 7 B und C) hat H-NS einen deutlichen Einfluß auf die Expression der Fusion. Mit beiden Substraten ist die Expression in der Mutante um mehr als die Hälfte geringer. Der Effekt, das *hns* Mutanten einen starkes Wachstumsdefizit bewirken, wird durch den direkten Vergleich der optischen Dichte umgangen und kann nicht die Ursache des Unterschiedes sein. Zwar war ein deutlich langsames Wachstum zu beobachten, aber die erreichte Zelldichte am Ende des Experimentes war nur geringfügig geringer als bei dem Vergleichsstamm.

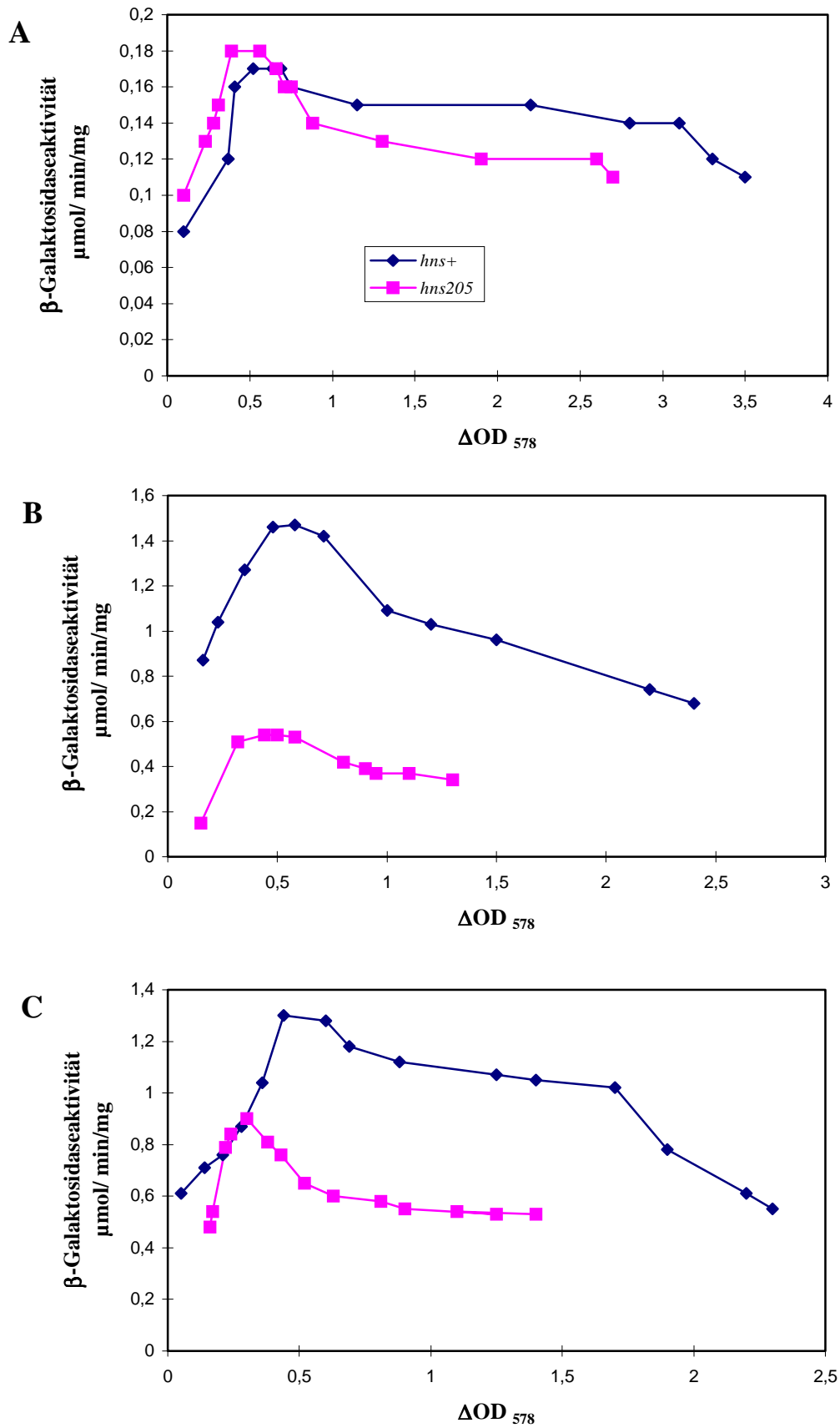


Abb. 7: Einfluß von *hns205* auf die Expression von *frdA-lacZ* Fusion bei Wachstum mit den Substraten Glucose (A), Fumarat (B) und Succinat (C) unter Anwesenheit von Sauerstoff

Die Zellen von MC4100 λ J100 (hns^+) und IMW189 ($hns205$) wurden in MMA unter Zusatz von Glucose, Fumarat und Succinat unter aeroben Bedingungen gezogen. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität in Abhängigkeit zur Zelldichte.

2 Einfluß von *hns* auf das Proteinmuster der Zelle

Pleiotrope Effekte von globalen Regulatoren lassen sich besonders gut durch zweidimensionale Gelelektrophorese analysieren, weil sie zu lassen, das Proteinmuster der gesamten Zelle zu erfassen und zusätzlich es ermöglichen, die Expression von Proteinen unter bestimmten Umweltbedingungen zu testen. Viele der Gene, die durch *hns* reguliert werden, sind durch zweidimensionale Proteingelelektrophorese identifiziert worden (Bertin *et al.*, 1990; Laurent-Winter *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 1991).

2.1 Übersicht der verschiedenen Effekte von *hns206::bla*

Bei Vergleich der Proteinmuster des Wildtypstammes mit einer *hns206*-Mutante ergibt sich typischerweise, daß in der Mutante die Anzahl der Proteine zunimmt. Durch die meist reprimierende Wirkung von *hns* wird die Expression vieler Gene durch H-NS unterdrückt oder ihre Expressionsstärke beeinflußt. Nur wenige Proteine werden durch *hns* aktiviert (Atlung & Ingmer, 1997). Im folgenden wurde die zweidimensionale Proteingelelektrophorese benutzt, um nach Unterschieden im Proteinmuster von Punktmutanten und Wildtypstamm bzw. *hns206*-Mutante zu suchen. Wie unter IV.1.1. gezeigt wurde, haben die Punktmutanten einen allelspezifischen Phänotyp, der sich in unterschiedlich starker Expression von *proU* zeigt. Weil dies für andere von *hns* regulierte Gene gilt, sollte man Expressionsunterschiede sehen.

Von den Stämmen MC4100 (*hns*⁺), PD32 (*hns206*), JML7 (*hns208*), JML10 (*hns210*), ALP3 (*hns229*) und ALP4 (*hns230*) wurden 250 ml LB-Kulturen angezogen und bei einer OD₅₇₈ von 0,8-1,0 bzw. 3,5 4,0 geerntet. Aus diesen Kulturen wurden Ganzzellextrakte hergestellt, und eine immer gleiche Menge von 400 µg an Protein wurden in die Rehydratisierungslösung gegeben, die von den IEF-Streifen für die erste Dimension vollständig absorbiert wurde. Nach der Auftrennung bezüglich des isoelektrischen Punktes wurden die Streifen auf das SDS-Polyacrylamidgel für die Größentrennung aufgetragen. Die Gele wurden mit Coomassie Blue gefärbt, auch wenn diese Färbemethode weniger sensibel ist, sollten augenfällige Unterschiede auch bei dieser Färbung deutlich werden. Im folgenden sind nur die Auftrennungen der jeweiligen Zellextrakte dargestellt, die in der Stationärphase geerntet wurden, weil in diesen Separationen Effekte zu sehen waren.

Voran wird ein Vergleich von dem Wildtypstamm und der *hns206*-Mutante gestellt, anhand dessen die Unterschiede der Punktmutanten beurteilt wurden.

Beim Vergleich von Wildtyp und *hns206*-Mutante (Abb. 8) ergibt sich das erwartete Bild: Auf dem Gel mit Zellextrakt von PD32 war eine deutliche Zunahme an Proteinen auf dem Gel festzustellen. Nur ein Protein kann reproduzierbar in MC4100 mehr gefunden werden. Aus der Literatur ist eine aktivierende Wirkung von *hns* nur für drei Proteine beschrieben. Mit einem Pfeil werden nur diejenigen Proteinspots bezeichnet, die auf mindestens drei unabhängigen Gelen reproduzierbar waren, wobei nur die deutlichen Unterschiede berücksichtigt worden sind. Die überwiegende Zahl an Genen wird von H-NS reprimiert, wobei in der Ausprägung Unterschiede

festzustellen sind. Nicht in allen Fällen kommt es zu einem kompletten Ausfall des Genprodukts, bei einigen mit schwarzen Pfeilen bezeichneten Proteinspots handelt es sich eine deutlich Veränderung der Expressionsstärke des Proteins. Durch den Ausfall von *hns* kommt es nicht in allen Fällen zu einem kompletten Repression der Genexpression. In wenigen Fällen bewirkt das Fehlen von *hns* auch eine Veränderung der Expressionsstärke, die sich allerdings allein aus der Größe oder der Intensität der Färbung allein nicht beurteilen läßt.

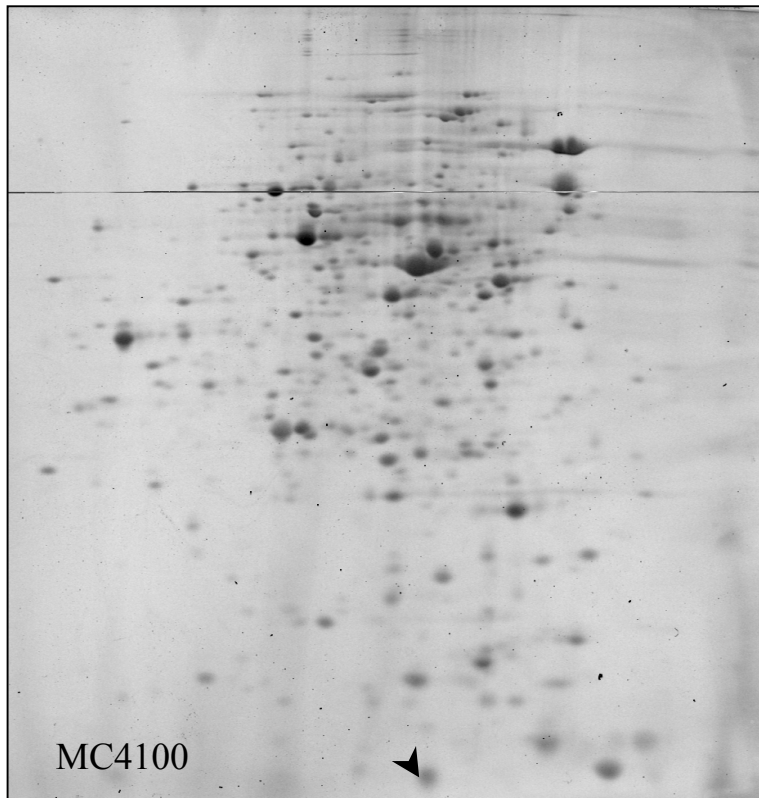
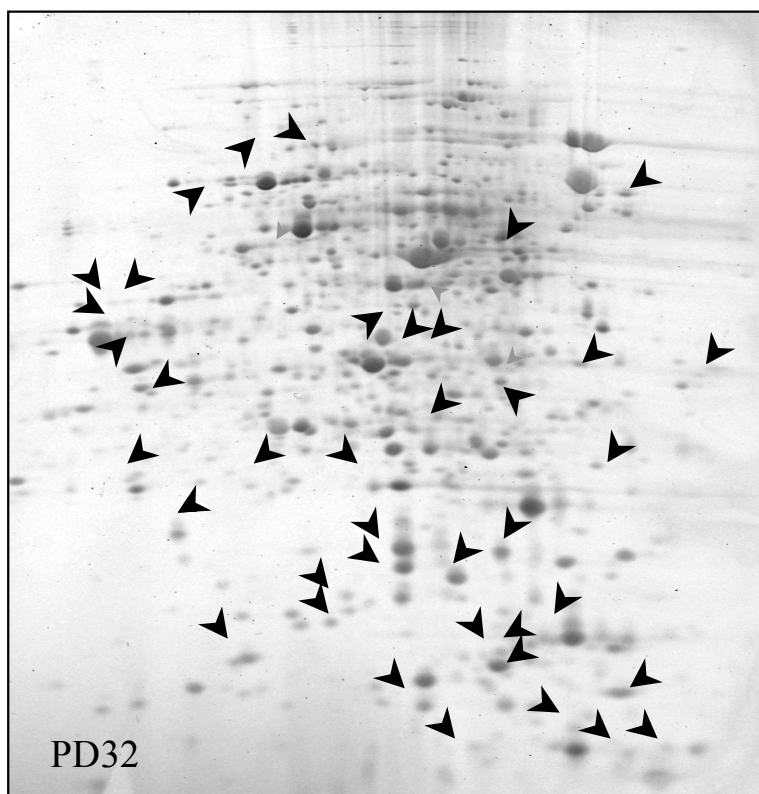


Abb. 8: Vergleich des Proteinmusters von MC4100 (*hns*⁺) und PD32 (*hns206::bla*)

Die schwarzen Pfeile indizieren zusätzlich in diesem Stamm exprimierte Proteine oder Proteine deren Expressionsstärke sich im Vergleich der beiden Muster verändert haben. Mit Pfeilen sind nur diejenigen Proteine gekennzeichnet, die auf drei unabhängigen Gelen reproduzierbar waren. Die dargestellten Gelausschnitte zeigen den pH-Bereich 5,2 – 7,5.



2.2 Einfluß verschiedener Punktmutanten auf das Proteinmuster von *E. coli*

Auf der Grundlage, daß sich Wildtyp und *hns206* Mutante deutlich unterscheiden wurden entsprechend von den Punktmutanten (Abb. 3) Ganzzellextrakte hergestellt und zweidimensional aufgetrennt und auf Unterschiede sowohl zum Wildtyp als auch zur *hns206*-Mutante untersucht. Weil sich für die Punktmutanten herausstellte (siehe IV.1), daß sie einen spezifischen Einfluß auf die *proU* Expression ausüben, sich bei Ihrem Einfluß auf die *bgl* Expression jedoch unterscheiden.

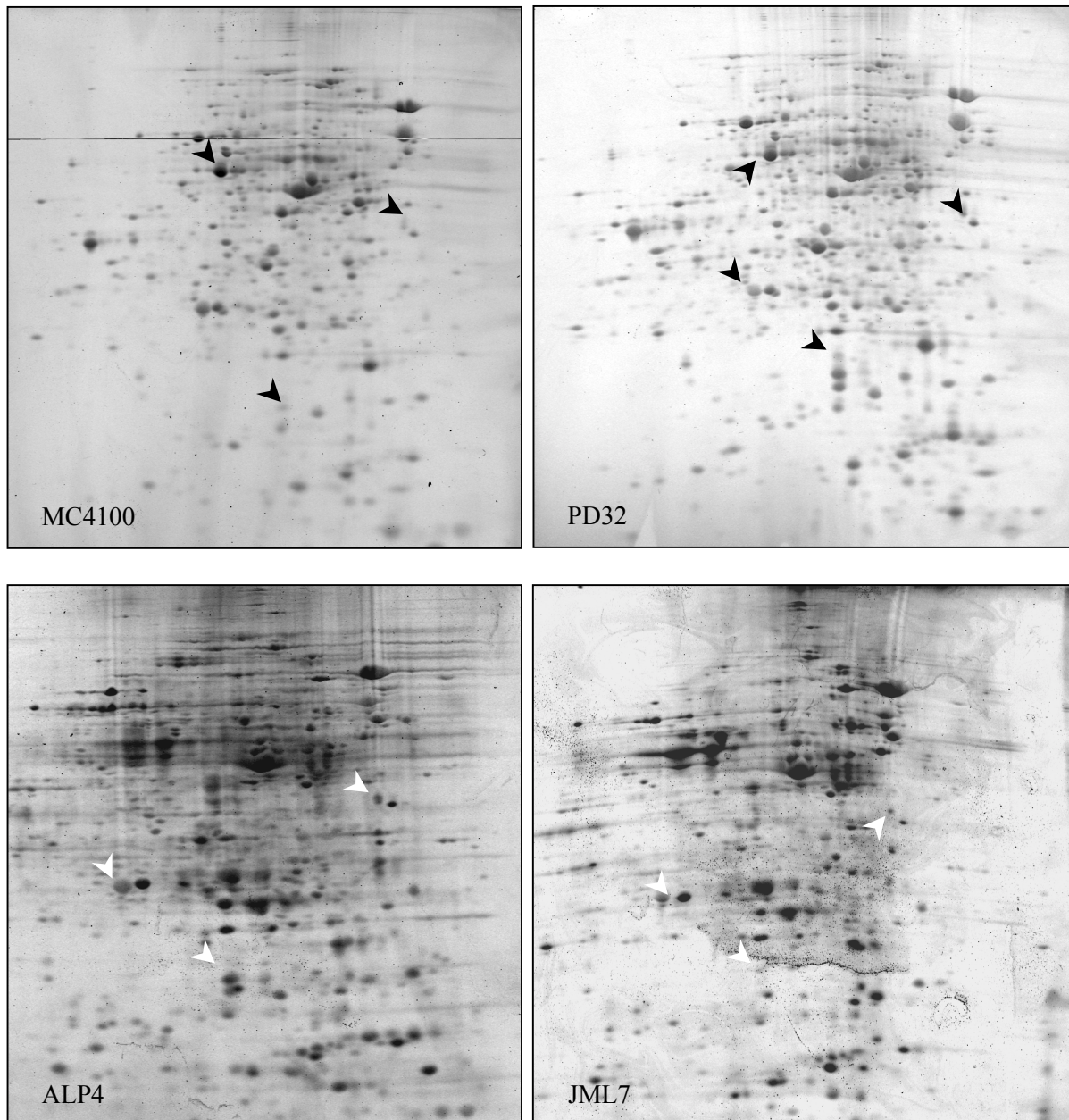


Abb. 9: Vergleich des Proteinmusters von MC4100 (*hns*⁺) und PD32 (*hns206*) mit den Mustern zweier exemplarisch ausgewählten *hns*-Punktmutanten

Die weißen bzw. schwarzen Pfeile indizieren die verändert expremierten Proteine. Mit Pfeilen sind nur diejenigen Proteine gekennzeichnet, die auf mindestens zwei unabhängigen Gelen reproduzierbar waren. Die dargestellten Gelausschnitte zeigen den pH-Bereich 5,2 – 7,5.

Es galt durch den Vergleich festzustellen, ob die Einflußnahme auf die *proU* Expression nur ein allelspezifischer Effekt ist oder, ob auch die Punktmutanten in der Lage sind einen pleiotropen Phänotyp zu verursachen (Abb. 9).

Die reproduzierbaren Unterschiede sind durch die Pfeile indiziert (Abb. 9). Auf eine Beschriftung der Pfeile wurde verzichtet, weil eine genaue Zuordnung von Proteinspots auf dem Gel zu Genprodukten nicht möglich ist, eine genaue Zuordnung ist nur durch das terminale Ansequenzieren des ausgestochenen Proteins möglich. Hier ging es jedoch um Aussagen, inwiefern die Punktmutationen das Proteinmuster verändern. Die hier gezeigten Mutantenstämme ALP4 und JML7 stehen stellvertretend für die vier untersuchten Mutanten (siehe Übersicht Abb. 3). Die *hns*-Punktmutanten beeinflussen das Proteinmuster nur geringfügig. Die Anzahl der neu hinzugekommenen Genprodukte ist weitaus geringer als bei der *hns206* Mutante, so daß sich daraus folgern läßt, daß die *hns* Punktmutanten generell nicht den pleiotropen Phänotyp der *hns206* Mutante zeigen, sondern nur eine beschränkte Zahl von Genen wirken (Vergleich auch Ergebnisse zur Transposition Kap 1.2). Nur vier Genprodukte, auf die mit Pfeilen hingewiesen wird, zeigen eine veränderte Expression, eine stärkere Ausprägung des Genproduktes als der Wildtyp.

Für die Herstellung des Ganzzellextraktes der Stämme GF1 (pALP1) und GF3 (pALP1) wurde ab einer OD₅₇₈ von 0,6 mit 1 mM IPTG induziert und die Stämme wie auch die anderen Zellextrakte in der stationären Phase geerntet. Das Plamid pALP1 trägt das Allel *hns224*, was das H-NS-Derivat H-NS224 mit dem Aminosäureaustausch Leu30Pro kodiert und dominant negativ gegenüber einem chromosomalen Wildtypallel ist. In dem Experiment trifft dieser Fall für den Stamm GF1 zu, der chromosomal das Wildtypallel trägt. Im Stamm GF3 wurde das *hns*-Wildtypgen durch das Allel *hns206::bla* ersetzt.

Im unteren Drittel der beiden unteren Gele (Abb. 10) sieht man deutlich die hinzugekommenen Genprodukte, die durch die Induktion des Plasmids pALP1 hervorgerufen werden. H-NS tritt in drei verschiedenen Isoformen auf (Spassky *et al.*, 1984; Ussery *et al.*, 1994), wobei nur diejenigen Formen, die im leicht sauren Bereich liegen in ausreichender Menge vorliegen, um auf dem Gel wahrgenommen zu werden. Auf dem Gel links sieht man zusätzlich auch das intakte H-NS und nicht wie in der Auftrennung rechts nur die entsprechenden H-NS224-Formen.

Die Unterschiede, zu dem Gel von MC4100 sind nicht sehr groß, wenn man in Betracht zieht, daß auch die Auftrennung nicht so vollständig ist wie bei dem Ganzzellextrakt von MC4100. Die Punktmutation hat nur eine allelspezifische Wirkung.

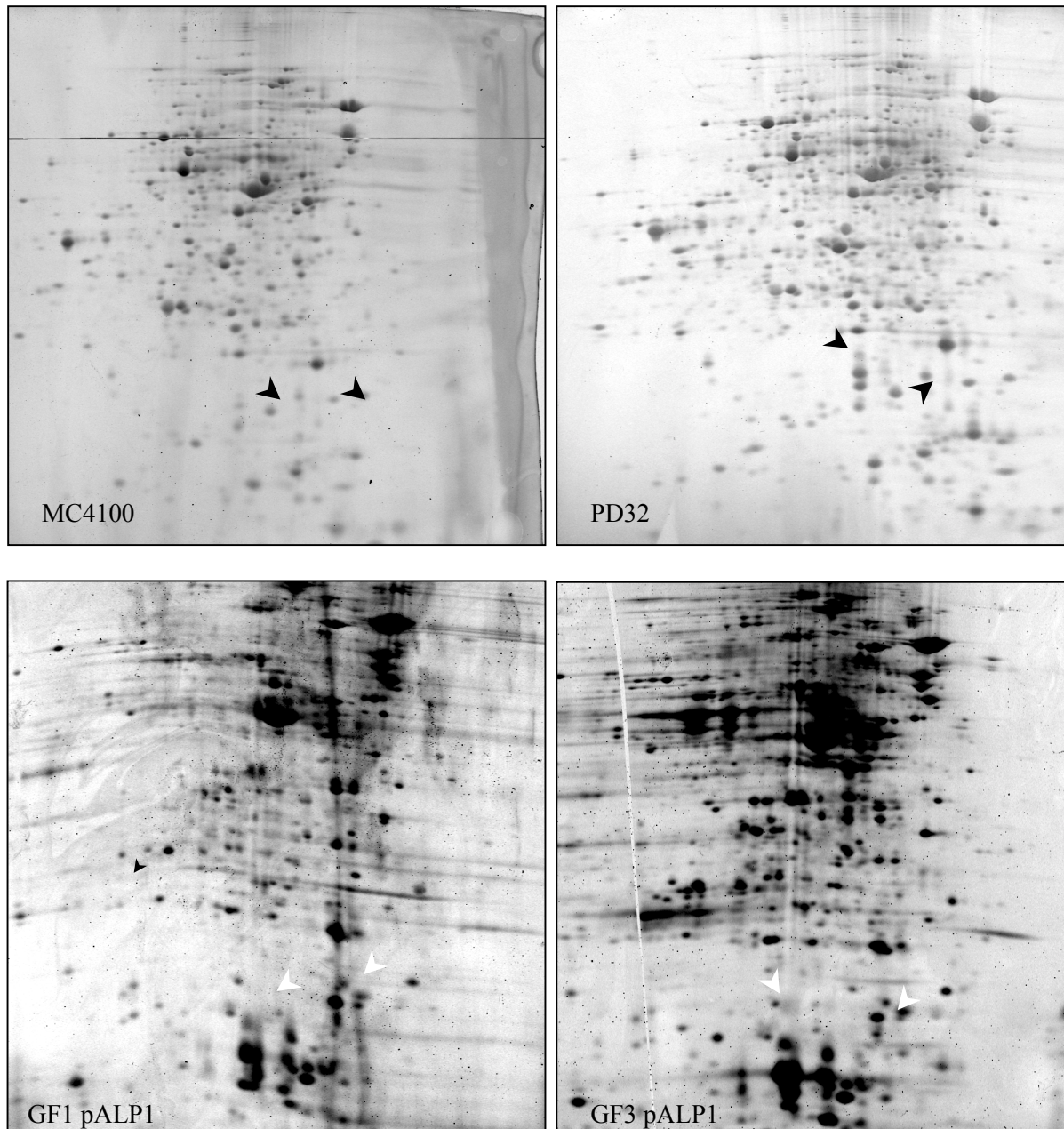


Abb. 10: Vergleich des Proteinmusters von MC4100 (*hns*⁺) und PD32 (*hns206*) mit den Mustern von Wildtyp und *hns206*-Mutante in denen das auf einem Überexpressionsplasmid lokalisierte *hns224* überproduziert wurde

Die weißen bzw. schwarzen Pfeile indizieren die verändert expremierten Proteine. Mit Pfeilen sind nur diejenigen Proteine gekennzeichnet, die auf mindestens zwei unabhängigen Gelen reproduzierbar waren. Die dargestellten Gelausschnitte zeigen den pH-Bereich 5,2 – 7,5.

3 Untersuchungen zum DNA-Bindevverhalten

Als Voraussetzung für seine Wirkungsweise als genregulierendes Protein ist es von großem Interesse den Modus zu untersuchen, über den H-NS bei der Aufgabe der Genomstrukturierung nicht nur unspezifisch an meist gebogene DNA zu binden, sondern höchst spezifisch im regulatorischen Bereich von durch H-NS kontrollierter Gene. Wie aus bisherigen Untersuchungen belegt

ist, bindet H-NS spezifisch an seine eigene Promotorregion (Dersch *et al.*, 1993) und an die regulatorische Bereiche, der von H-NS kontrollierten Gene, von denen in unserer Arbeitsgruppe besonders das Bindeverhalten von *proU* eingehend studiert wurde (Lucht *et al.*, 1994). Es sollte, nachdem das Wildtypprotein biochemisch charakterisiert und das DNA-Bindeverhalten studiert worden war, und es dadurch Hinweise auf die molekulare Wirkungsweise gab, anhand von mehreren Mutanten der molekulare Wirkungsmechanismus näher untersucht werden.

3.1 Indirekter Nachweis des DNA-Bindeverhaltens

3.1.1 Konstruktion der pBAD-Derivate

Das verwendete Plasmid trägt den P_{BAD}-Promotor des Arabinoseoperons *araBAD* und stromaufwärts das *araC* Gen, das den Regulator AraC des Operons kodiert (Hendrickson & Schleif, 1984). In Abwesenheit des Induktors L-Arabinose bindet AraC als Dimer, verformt die Promotorregion zu einer Schleife und verhindert die Bildung des offenen Komplexes (Zhang *et al.*, 1996). Bei Anwesenheit von L-Arabinose wird die Konformation von AraC so verändert, daß die Schleife aufgelöst und die Repression aufgehoben wird. Die Expression über den P_{BAD}-Promotor wird in linearer Abhängigkeit durch die Zugabe von Arabinose gesteuert.

Da in unserem Labor die Punktmutanten, die im C-terminalen Bereich lokalisiert sind, jeweils nur als chromosomale Mutanten vorliegen, wurden die betreffenden Abschnitte des *hns*-Strukturgens aus dem Wildtypstamm MC4100 und den Mutantenstämmen JML7, JML10, ALP3 und ALP4 mittels PCR und spezifischen Primern, die an beiden Enden Restriktionsschnittstellen mitlieferten, amplifiziert (Abb. 11).

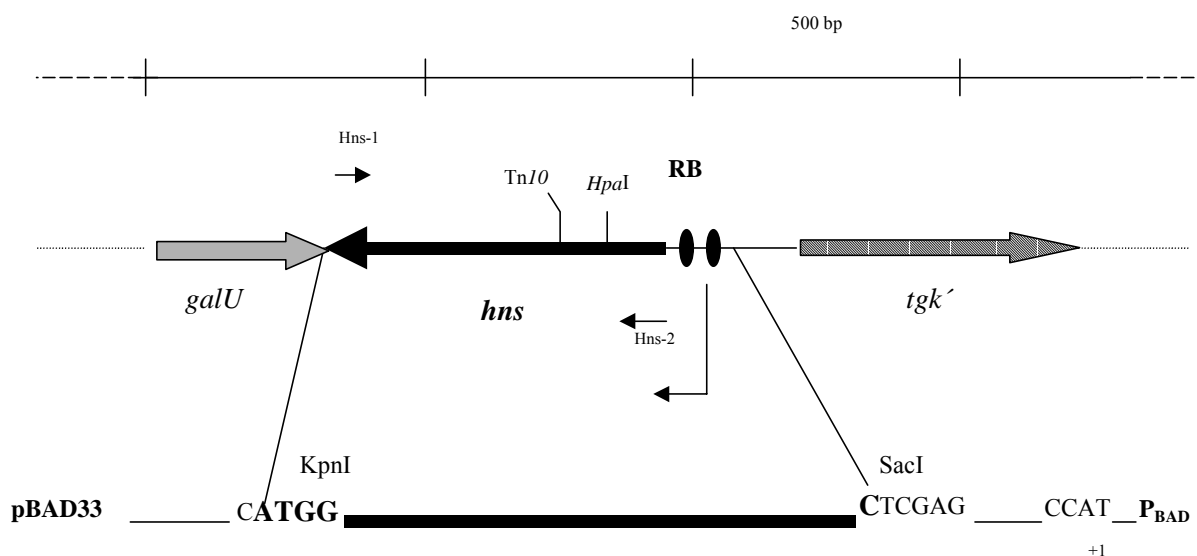


Abb. 11: Konstruktion der pBAD-Derivate

Oben ist das *hns* Gen in seiner chromosomalen Umgebung, das mittels PCR aus Wildtypstamm bzw. aus den Mutantenstämmen amplifiziert wurde, dargestellt. Vor der Ribosombindestelle (RB) ist der Transkriptionsstartpunkt des *hns* Gens eingezeichnet. *Hns-1* und *Hns-2* bezeichnen die Primer, die Pfeile die Richtung der durch die Primer initiierten Synthese. Unten wird der Ausschnitt von pBAD33 gezeigt, in den das *hns* Gen eingesetzt wurde. Fettgedruckte Sequenzabschnitte stammen von *hns*. Die Konstrukte wurden zur Überprüfung sequenziert.

Dabei wird außer dem Strukturgen, auch die Ribosombindestelle und die Transkriptionsinitiationssequenzen des *hns* Gens mit amplifiziert, nur der Promotor stammt von dem pBAD-Derivat pBAD33. Das Plasmid und die PCR-Fragmente wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten, anschließend ligiert und transformiert.

Die pBAD-Konstrukte (Tab. 9) wurden sequenziert, wobei sich bei einen Klon, der das mittels PCR amplifizierte Wildtyp *hns* Gen trug, daß im 14. Codon an zweiter Position ein Thymin durch ein Cytosin ausgetauscht wurde. Der Austausch beruht wahrscheinlich auf eine Ableseungenauigkeit der Taq-Polymerase. Der Basenaustausch führte zu einem Aminosäuretausch, so daß anstelle eines Leucins ein Prolin in die Primärsequenz des Proteins eingebaut wird. Das Plasmid pBZ14 trägt das neue Allel *hns233*.

Tab. 9: Lokalisation der *hns*-Punktmutationen in den verschiedenen pBAD-Derivaten

Dargestellt ist der Ort des Aminosäureaustausches der in dieser Arbeit hergestellten pBAD-Derivate. Das Allel *hns233* ist bei der PCR durch Ableseungenauigkeit der Taq-Polymerase entstanden.

Plasmid	Allel	Aminosäureaustausch bzw. Deletion
pBZ3	<i>hns</i> ⁺	
pBZ4	<i>hns208</i> ^r	ΔAla46
pBZ5	<i>hns210</i>	T110A
pBZ6	<i>hns229</i>	G111D
pBZ7	<i>hns230</i>	G113D
pBZ14	<i>hns233</i>	L14P

3.1.2 Komplementation der *hns206::bla* Mutation

Das pBAD-System wurde eingesetzt, um zu bestimmen, bei welcher Menge an Arabinose, die einer entsprechenden Induktion des pBAD-Systems entspricht, die gebildete H-NS-Menge ausreicht, um ein von H-NS reguliertes Gen, hier das *proU*-Operon zu reprimieren. Ein solcher Ansatz, um das Verhalten von globalen Regulatoren zu studieren, wurde auch für das Protein Lrp angewandt (Borst *et al.*, 1996).

Hierzu wurde in einen Stamm, der von dem Stamm W3110 abstammt, und in dem das *lac*-Gen deletiert war, durch P1_{vir}-vermittelte Transduktion eine *proU-lacZ* Fusion eingeführt. Zusätzlich zu dem *hns*-Wildtypstamm BZ52 wurde ein ansonsten isogenischer *hns206*-Stamm (BZ53). Anschließend werden beide Stämme mit einem pBAD-Derivat transformiert, das entweder das Wildtyp- oder ein mutiertes *hns*-Gen trägt. Der Stamm W3110 wurde deshalb verwendet, weil er keine Deletion des Gens *araD*- trägt, wie der sonst verwendete Stamm MC4100, auf den Arabinose im Medium toxisch wirkt (Engelberg *et al.*, 1962). Die Zellen wurden in MMA-Medium mit 0,2% Glucose ohne oder mit 0,2% L-Arabinose bei 37°C angezogen.

Zuerst wurde geklärt, inwieweit die Fähigkeit den Phänotyp der *proU* Repression herzustellen von verschiedenen auf Plasmid kodierten *hns* Allelen geleistet werden kann, und ob die Menge von H-NS, die durch das pBAD-System produziert wird, ausreicht *hns* zu komplementieren (Abb. 12).

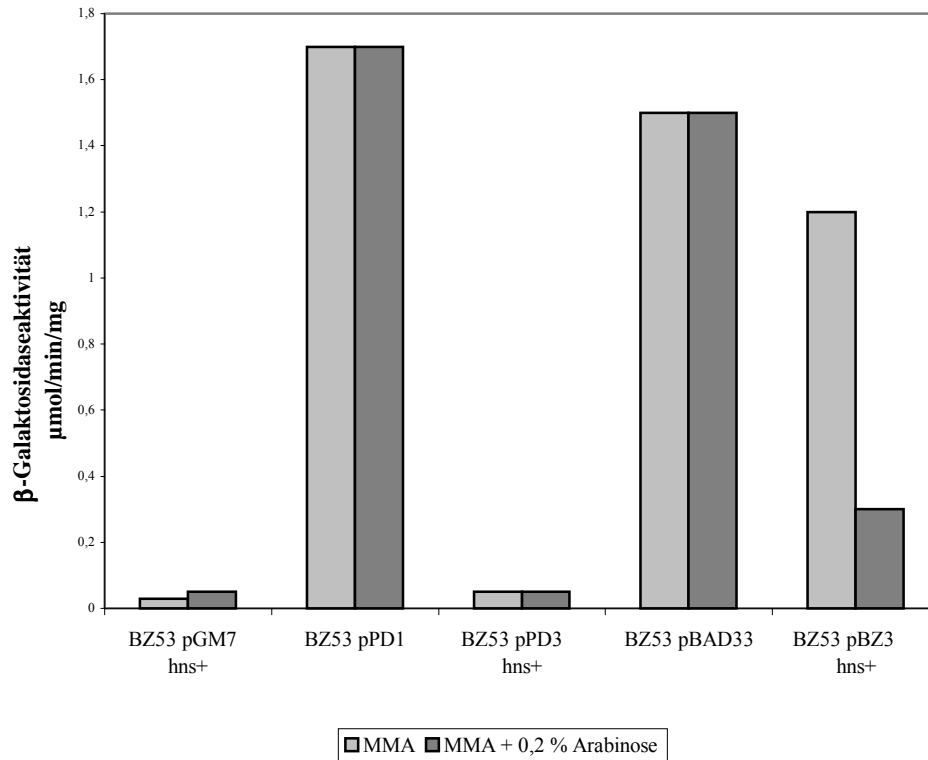


Abb. 12: Komplementation der *hns*-Insertion *hns206::bla* durch das auf pBAD33 lokalisierte *hns*⁺ Gen

BZ53 trägt die Insertionsdeletion *hns206::bla*. Die Plasmide pGM37 und pPD3 kodieren das Wildtyp *hns*, wobei es sich bei pGM37 um ein Klonierungsvektor, bei pPD3 um ein Expressionsplasmid mit T7Φ10-Promotor handelt. pPD1 ist das Expressionsplasmid ohne *hns* Gen. Die Plasmide pBAD33 und pBZ3 sind Plasmide mit dem P_{BAD}-Promotors, wobei nur pBZ3 das *hns* Wildtypgen trägt. Die hellen Säulen zeigen die β-Galaktosidaseaktivität der *proU-lacZ* Fusion in den Kulturen, die nicht induziert wurden, die dunklen, die in den mit 0,2% Arabinose induzierten Kulturen.

Die Kontrollstämme, in die nur die leeren Vektoren pPD1 und pBAD33 transformiert wurden, zeigen, daß der Ausfall des chromosomalen *hns*-Gens zur Derepression der *proU-lacZ* Fusion führt. Die Anwesenheit von Arabinose hat auf die Expression von *hns* von dem Plasmid pGM7 und von dem Expressionsplasmid pPD3 erwartungsgemäß keinen Einfluß, weil vor dem *hns* Gen Promotoren liegen, die von Arabinose unabhängig sind. Wenn der Stamm jedoch das *hns* Wildtypgen auf dem pBAD-Derivat enthält, ist eine deutliche Repression bei Induktion mit 0,2% Arabinose festzustellen. Die Menge an H-NS, deren Expression durch die Zugabe von 0,2% Arabinose induziert wird, reicht aus, um den Wildtyp-Phänotyp wieder herzustellen.

Führt man analog den gleichen Versuch mit den verschiedenen *hns*-Derivaten durch, ergibt sich, daß die Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps durch die verschiedenen Punktmutanten nicht geleistet werden kann (Abb. 13).

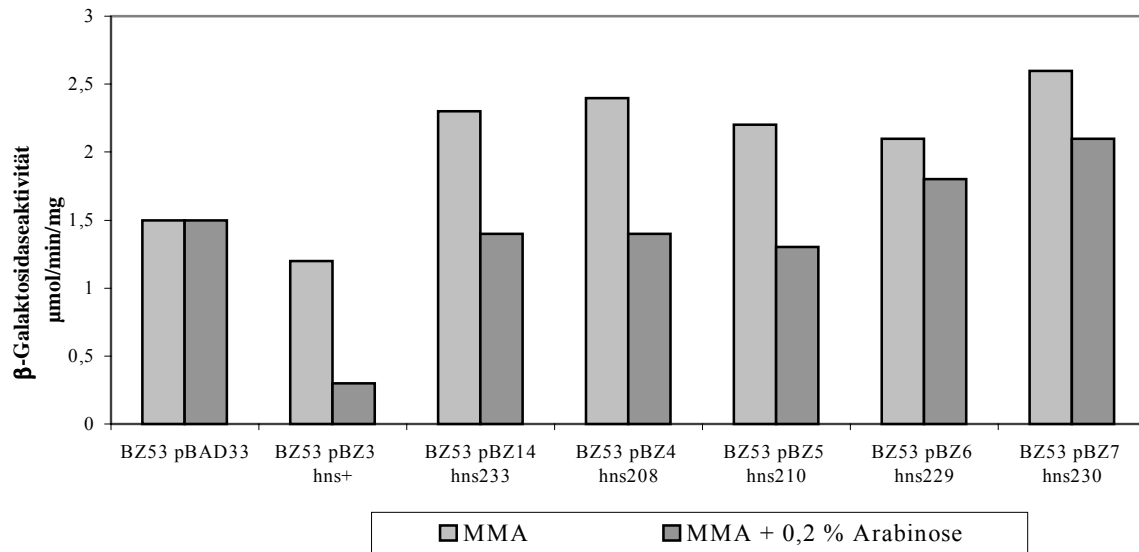


Abb. 13: Komplementation der *hns206::bla*-Mutation durch verschiedene *hns*-Derivate

Der Stamm BZ53 trägt chromosomal die *hns206::bla*-Insertionsmutante. Das Plasmid pBAD33 ist der leere Vektor, das Plasmid pBZ3 trägt das Wildtypgen, die Plasmide pBZ4-7 *hns*-Punktmutationen, die Bezeichnung der Allele folgt der in Tab. 9. Die hellen Säulen zeigen die β -Galaktosidaseaktivität der *proU-lacZ* Fusion in den Kulturen, die nicht induziert wurden, die dunklen, die in den mit 0,2% Arabinose induzierten Kulturen.

Mißt man nach dem gleichen Prinzip die β -Galaktosidaseaktivität der *proU-lacZ* Fusion in Stämmen mit intaktem *hns*, zeigen alle Punktmutanten einen dominant-negativen Phänotyp, d. h. der auf dem Plasmid kodierte Defekt im *hns*-Strukturgen setzt sich gegenüber dem chromosomalen intakten Gen durch (Abb. 14).

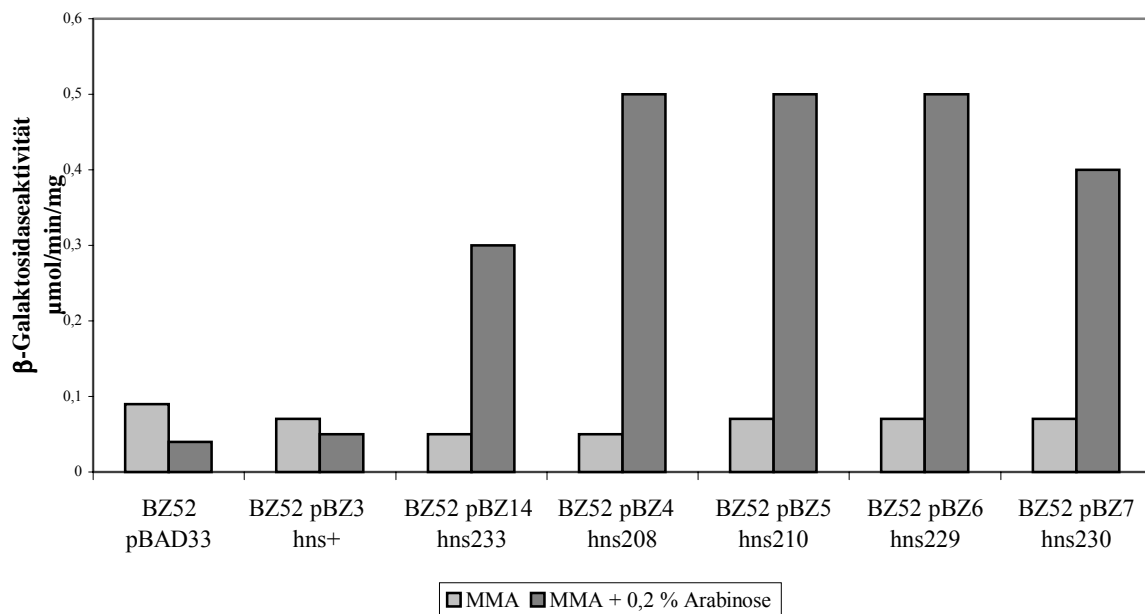


Abb. 14: Die Mutanten *hns208*, *hns210*, *hns229*, *hns230* und *hns233* zeigen einen dominant-negativen Phänotyp

Der Stamm BZ53 trägt chromosomal die *hns206::bla*-Insertionsmutante. Das Plasmid pBAD33 ist der leere Vektor, das Plasmid pBZ3 trägt das Wildtypgen, die Plasmide pBZ4-7 *hns*-Punktmutationen, die Bezeichnung der Allele folgt der in Tab. 9. Die hellen Säulen zeigen die β -Galaktosidaseaktivität der *proU-lacZ* Fusion in den Kulturen, die nicht induziert wurden, die dunklen, die in den mit 0,2% Arabinose induzierten Kulturen.

Um die Abhängigkeit der H-NS-Synthese von der eingesetzten Arabinose deutlicher aufschlüsseln zu können, wurden Bakterienkulturen in MMA-Medium mit 0,2% Glucose mit unterschiedlichen Arabinosemengen angezogen. Weil die Menge an H-NS in der Zelle von der Wachstumsphase beeinflusst wird, wurden Proben bei verschiedener OD₅₇₈ genommen, die der frühexponentiellen, spätexponentiellen und der stationären Wachstumsphase entspricht. Mit diesen Proben wurden einerseits β -Galaktosidasetests durchgeführt andererseits wurde eine konstante Menge Zellextrakt in Western Blots eingesetzt (Abb. 15 und 16).

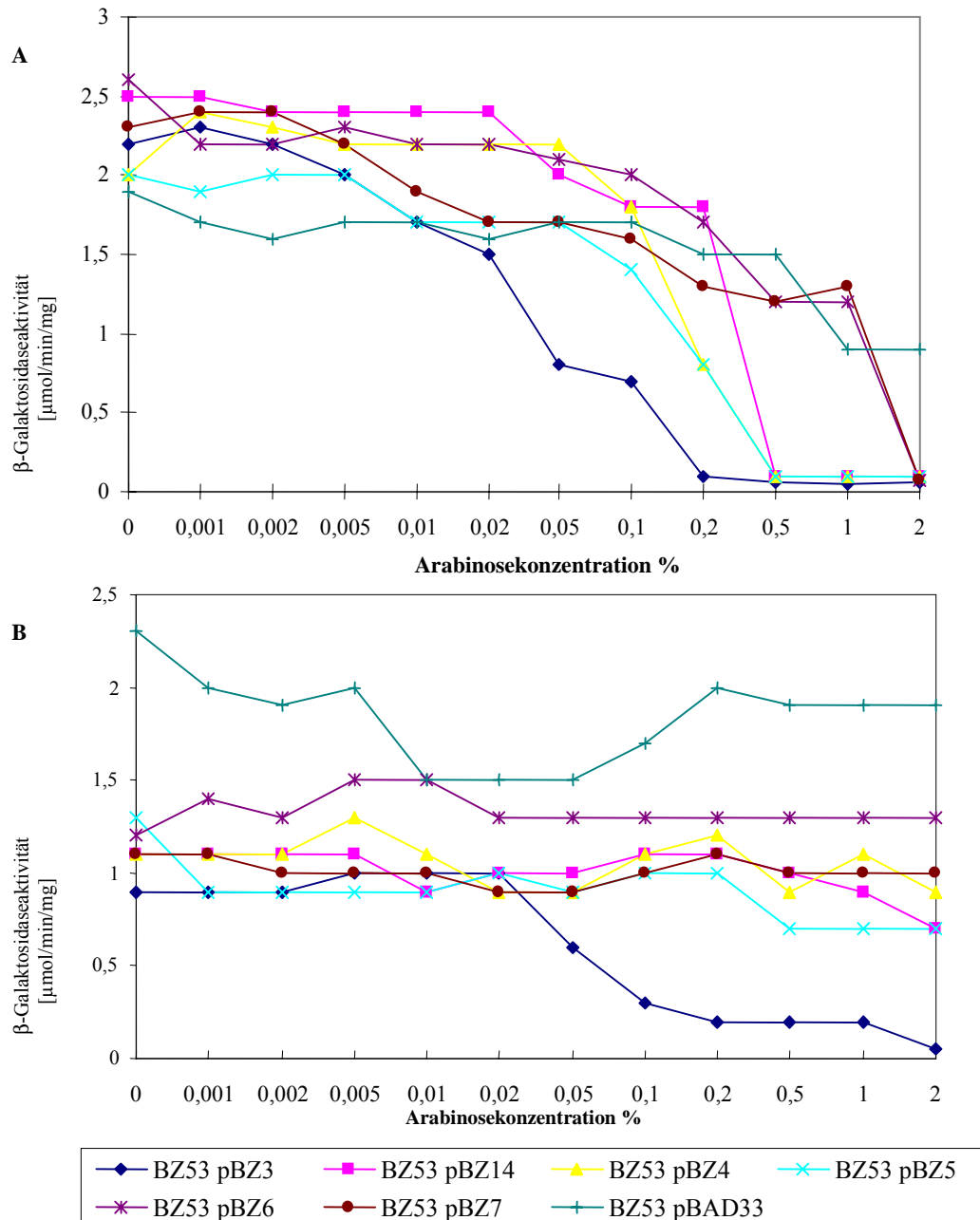


Abb. 15: Fähigkeit der *hns*-Punktmutanten die Expression der *proU-lacZ* Fusion zu vermitteln

Die Abbildung zeigt die β -Galaktosidaseaktivität der *proU-lacZ* Fusion in Stamm BZ53 *hns206::bla*, der in MMA-Medium mit unterschiedlicher Arabinosekonzentration gezogen wurde und der P_{BAD}-Promotor entsprechend unterschiedlich stark induziert wurde. Die Enzymaktivität wurde in Zellen der stationären Phase (A) und in der frühexponentiellen Phase (B) bestimmt. Die Zuordnung der Plasmide zu den jeweiligen *hns*-Allelen ist Tab. 9 zu entnehmen.

In der Konzentrationsreihe von BZ53 mit dem das Wildtypgen enthaltenden Plasmid pBZ3 (Abb. 15 A) wurde in der stationären Phase bei einer Arabinosemenge von 0,2% eine vollständige Repression erzielt. Für die parallel vermessenen Punktmutanten wird die Repression bei höherer Arabinosemenge erreicht, für die Stämme mit dem Plasmid pBZ14, pBZ4 und pBZ5 bei einer Menge von 0,5% Arabinose, für die Stämme mit Plasmid pBZ6 und pBZ7 erst bei der höchsten, eingesetzten Arabinosemenge von 2%. Die Expression vom *proU-lacZ*, in BZ53, der den leeren Vektor trägt, bleibt bei allen Arabinosemenge konstant, eine deutliche Repression kann nicht beobachtet werden. Eine geringe Repression ist bei den eingesetzten Arabinosemengen 1% und 2% festzustellen, sie ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Zellen bei diesen Konzentrationen unter Streß stehen, der sich generell auf die Enzymaktivität und auf die Proteinmenge auswirkt. Denn wie in Abb. 16 für H-NS und H-NS233 deutlich wird, ist die auch Proteinmenge bei diesen Arabinosemengen reduziert. Die geringe Enzymaktivität bei 1% und 2% Arabinose ist also kein ausschließlich von H-NS hervorgerufener Effekt.

In der frühen exponentiellen Phase (Abb. 15 B) und in der spät exponentiellen Phase (Daten nicht gezeigt) kann nur in den Stämmen, die das Plasmid mit dem Wildtypgen enthalten, Repression von *proU-lacZ* beobachtet werden. Bei den untersuchten Punktmutanten reicht die Menge an H-NS, die in der exponentiellen Phase angereichert wird nicht aus, um *proU* zu reprimieren.

Ob die Menge das entscheidende Kriterium oder die Bindefähigkeit des jeweiligen Proteins der Punktmutanten ist, sollte über die Bestimmung der Menge mit Hilfe von Western Blots geklärt werden. Für die Western Blots wird ein polyklonaler Antikörper benutzt, der natives H-NS erkennt und hochempfindlich ist. Gezeigt werden exemplarisch nur der Western Blot von BZ53 mit Plasmid kodiertem *hns*⁺ und *hns233*, die anderen Punktmutanten ergaben das gleiche Bild.

Wie in den Western Blots (Abb. 16) deutlich wird, nimmt mit steigender Arabinose-Konzentration die Menge an synthetisiertem Protein kontinuierlich zu. Bei den Arabinosemengen von 1% und 2% ist jedoch ein deutlicher Rückgang der Mengen nachweisbar. Möglich ist, wie bereits für die β -Galaktosidaseaktivität erwähnt, daß bei diesen hohen Mengen die Zelle an ihr osmotisch verkräftbares Limit stößt und die Überproduktion an H-NS-Protein dadurch nicht mehr möglich ist. Hierzu paßt, daß auch bei der Messung der β -Galaktosidaseaktivität in dem Kontrollstamm mit dem leeren Plasmid BZ53 pBAD33 die Aktivität der *proU-lacZ* Fusion auch geringfügig zurückgeht. Durch das Experiment (Abb. 15 und 16) konnte nachgewiesen werden, daß die Punktmutationen zu viel geringerem Maße in der Lage sind die Aktivität der *proU-lacZ* Fusion zu reprimieren, weil die Repression erst bei höherer H-NS-Menge erreicht wird. Weiter läßt sich schließen, daß obwohl Wildtyp- und mutierte Proteine in vergleichbarer Menge vorliegen, die Proteine, die eine Punktmutation besitzen, eine geringere Fähigkeit besitzen an *proU* Target spezifisch zu binden.

Das pBAD-System eignete sich nicht für die Überexpression von H-NS, weil die erhaltenen Proteinmengen so gering waren, daß sie nur durch Western Blot nachweisbar waren (Abb. 16).

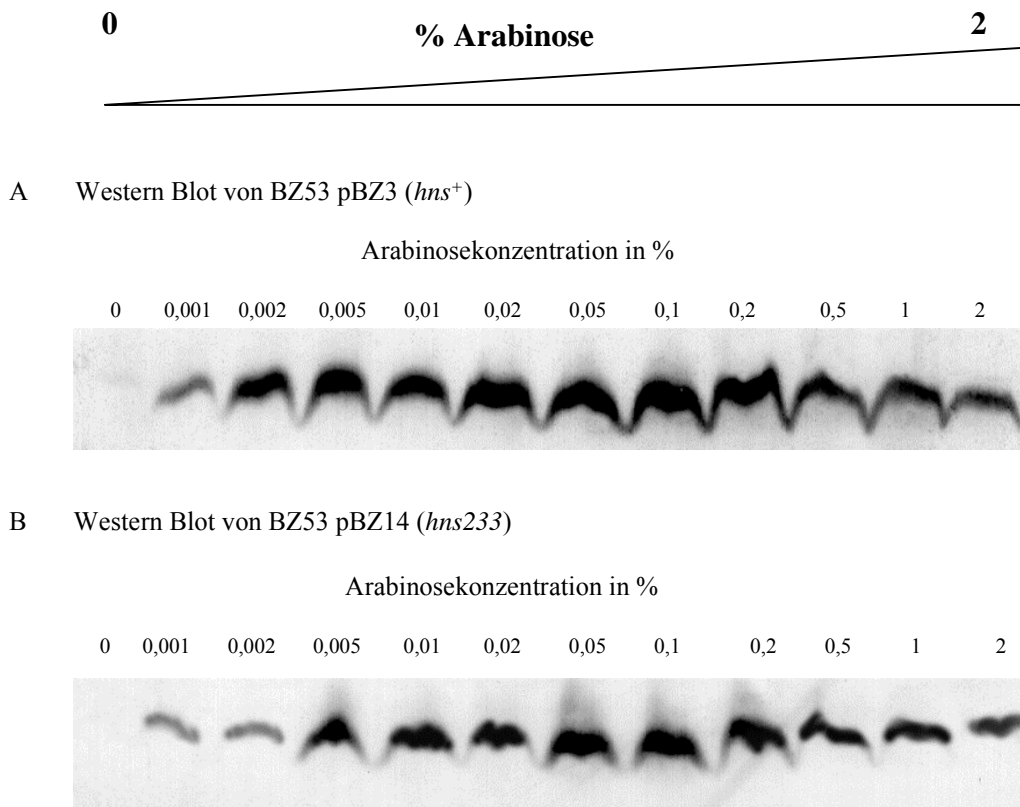


Abb. 16: Western Blot zur Darstellung der Abhängigkeit der H-NS-Menge von der Arabinose-Konzentration

Abb. 16 A zeigt die H-NS-Mengen aus BZ53 *hns206::bla*, in den das Plasmid mit dem *hns*-Wildtypgen transformiert wurde. Abb. 16 B zeigt die Proteinmengen aus BZ53 *hns206::bla*, der das Plasmid mit dem *hns233*-Gen enthält. Die Zellen wurden in MMA mit Glucose und der in der Abb. angegebenen Arabinosemenge bis zu einer OD₅₇₈ von 1,5 gezogen, geerntet und ein Gesamtzellextrakt hergestellt. Die Menge an aufgetragenem Protein ist in allen Spuren gleich. H-NS wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen natives H-NS nachgewiesen.

3.2 Direkter Nachweis des Bindeverhaltens

Der direkte Nachweis von DNA-Bindung erfolgt in *in vitro*-Experimenten, in denen gereinigtes Protein zusammen mit präparierter DNA, an die das Protein spezifisch und unspezifisch binden kann, inkubiert wird und anschließend die Komplexe auf einem Agarosegel aufgetrennt werden. Voraussetzung, um eine spezifische Bindung nachzuweisen, ist gereinigtes Protein.

3.2.1 Überexpression der Punktmutanten

Um für die anschließende Reinigung von genügend Material ausgehen zu können, wird meist auf Expressionssysteme zurückgegriffen, die das gewünschte Protein im Vergleich zu den übrigen Zellproteinen in deutlich erhöhtem Maße liefern, wodurch schon vor folgenden Reinigungsschritten eine Ankonzentrierung des Proteins erreicht wird.

Wie bereits erwähnt, existierten die vier interessierenden Punktmutanten nur chromosomal. Durch PCR- wurden zuerst aus dem Genom die entsprechende Sequenzen des mutierten Strukturgens amplifiziert und in das pBAD-Expressionssystem kloniert (siehe IV.3.1.1). Die erhoffte Überexpression war nicht den Erwartungen entsprechend und ließ sich nur in Western Blots nachweisen. Auf Proteingelen ergab sich keine deutlich sichtbare Bande, die auf der Höhe von H-NS gelaufen ist. Aus den pBAD-Konstrukten wurden die entsprechenden Bereiche des *hns*-Strukturgens vom Wildtyp und den Mutanten *hns208*, *hns210*, *hns229*, *hns230* und *hns233* ausgeschnitten und in den Überexpressionsvektor pPD100 umklont. Dieser Vektor gehört in die Gruppe der Expressionsvektoren, die das T7 Φ 10/T7-RNA-Polymerase-Expressionssystem mit chromosomal kodierter und mit IPTG-induzierbare T7-RNA-Polymerase nutzen. Das System, das von Tabor und Richardson (1985) etablierte und durch Studier und Moffatt (1986) vervollkommnende System nutzt folgende Eigenschaften der TNA-Polymerase des Bakteriophagen T7. Sie ist im Gegensatz zur *E. coli* RNA-Polymerase ein sehr stabiles und aktives Enzym, weiter bindet sie ausschließlich an die konservierte 23 bp T7-Promotorsequenz, sie erkennt keine *E. coli*-Promotoren. Dieses System ermöglichte auch schon das Wildtypprotein erfolgreich überzuexpressieren (Dersch *et al.*, 1994). Die T7-RNA-Polymerase wird durch die entsprechenden Expressionsstämme geliefert, sie stehen im Fall von BL21 und GF1/GF3 unter Kontrolle des *lac*-Repressors LacI und des *lacUV5*Promotors, der sich durch die Zugabe von IPTG regulieren läßt.

Nach einstündiger Induktion wird durch die Zugabe des selektiv auf die RNA-Polymerase wirkenden Antibiotikums Rifampicin das Proteinverhältnis weiter zugunsten des zu produzierenden Proteins verschoben. Aufgrund von Unverträglichkeit von großen Mengen an H-NS für die Zelle (Dersch *et al.*, 1994) werden für *hns* anstelle der üblichen high-copy-number Plasmide low-copy-number Plasmide verwendet. Alle im folgenden verwendeten Plasmide sind Derivate von pPD100.



Abb. 17: Western Blot aus Ganzzelextrakten nach Überproduktion von H-NS und H-NS* im IPTG-induzierbaren T7-RNA-Polymerase-Expressionssystem

Spuren 1: GF1 *hns*⁺; 2: GF3 *hns206*; 3: GF3 (pBZ8) *hns*⁺ ohne IPTG; 4: GF3 (pBZ8) *hns*⁺ mit IPTG, Induktion 1h; 5: GF3 (pBZ8) *hns*⁺ mit IPTG, Induktion 3h; 6: GF3 (pBZ9) *hns208*, Induktion 3h; 7: GF3 (pBZ10) *hns210*, Induktion 3h; 8: GF3 (pBZ11) *hns229*, Induktion 3h; 9: GF3 (pBZ12) *hns230*, Induktion 3h

Auch die Umklonierung und die Überexpression in MMA-Medium mit IPTG als Induktor resultierte nicht in der erwarteten Menge, die Proteinmengen sind nicht auf einem Proteingel sichtbar und lassen sich nur im Western Blot (Abb. 17) nachweisen. Spur 1 zeigt den *hns*-

Wildtypstamm GF1, der chromosomal eine IPTG-induzierbare T7-RNA-Polymerase trägt und Spur 2 den *hns206::bla*-Stamm GF3. Die schmale Bande ist auf Kreuzreaktion des native H-NS-Antikörpers mit dem in geringeren Mengen vorliegenden StpA-Protein zu erklären, das ebenso gut von dem Antikörper erkannt wird. Auf die Kreuzreaktion des H-NS-Antikörpers mit der StpA-Proteinbande ist auch die dünne Bande in Spur 3 zurückzuführen, die den Stamm GF3 *hns206::bla* und das Plasmid pBZ8 *hns*⁺ zeigt. In den Spuren 4-9 wurde Ganzzellextrakte, die H-NS, H-NS208, H-NS210, H-NS229 oder H-NS230 3 h nach der Induktion mit IPTG enthalten, es hat keine Überproduktion stattgefunden.

Die Produktionsleistung des Stammes GF3 *hns206::bla* ist nicht mit der des Stammes BL21, ein *E.coli* B Stamm, und dessen Derivaten vergleichbar, mit dem das Wildtypprotein in großen Mengen produziert werden konnte. Ein *hns206*-Derivat von BL21 ließ sich durch P1_{vir}-vermittelte Transduktion nicht erreichen. Versucht wurde eine Überproduktion zu erhalten mit einem BL21-Derivat JH916, der das Allel *hns205* trägt, aber auch mit diesem Stamm konnten keine Überproduktion erreicht werden.

Ebenso wurde mit einem T7Φ10/T7-RNA-Polymerase-Expressionssystem verfahren, das die IPTG induzierbare T7-RNA-Polymerase auf einem Plasmid trägt. Hierzu wurde das Plasmid pGP2-1 verwendet. In den Wildtypstamm MC4100 und den Stamm PD32 *hns206* wird das Plasmid pGP2-1 transformiert, anschließend die entsprechenden Überexpressionsplasmide. Aber auch mit diesem System wurde keine Überproduktion erreicht.

Außerdem wurden die Stämme LEPR7 und BZ35 (*hns206*) getestet, die über eine Hitze induzierbare T7-RNA-Polymerase verfügen, aber auch mit diesen Stämme wurde keine Mengenproduktion erreicht. Das Protein für die Reinigungen der chromosomalen Mutanten wurde im folgenden aus Zellextrakt durchgeführt, das in Anzuchten im großen Maßstab (2x 5 l) gewonnen wurde.

3.2.2 Reinigung der Proteine H-NS und H-NS224

Für die Herstellung des Zellextraktes für die Reinigung von H-NS und H-NS224 wurden die Zellen in MMA-Medium mit Zusätzen bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6 wachsen lassen, dann 1h mit IPTG induziert und die Zellen dann für eine weitere Stunde mit Rifampicin wachsen lassen. Nach der Überproduktion werden die Zellen geerntet, in Auftragspuffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl) aufgenommen und durch Scherkräfte in der FrenchPress aufgeschlossen. Die Proteinsuspension wurde auf eine Heparinsäule aufgetragen.

Für beide Proteine ist es möglich, deutliche Überproduktion mit dem T7Φ10/T7-RNA-Polymerase-Expressionssystem zu gewinnen, wie in Spur 1 und 5 erkennbar ist (Abb. 18).

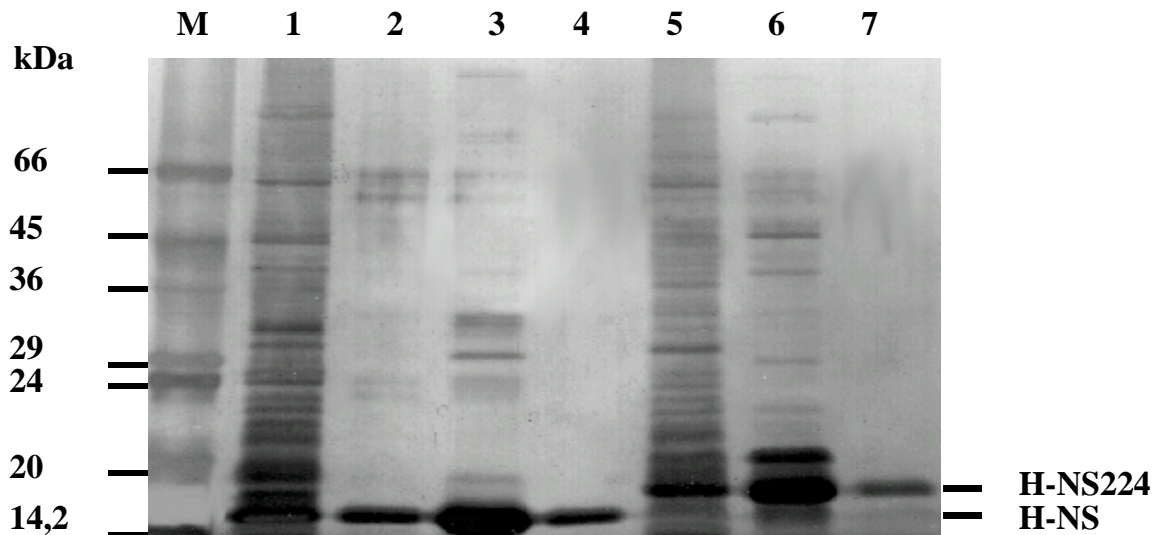


Abb. 18: Proteinreinigung von H-NS und H-NS224

Die Reinigung des Wildtypproteins ist in Spur 1-4, die von H-NS224 ist in Spur 5-7 gezeigt. Spuren **M**: low weight marker; **1**: Zellextrakt von BL21 pPD3; **2**: Reinigung über eine Heparinsäule; **3**: 2. Reinigung über eine Heparinsäule; **4**: 2. Reinigung über eine DNA-Cellulose-Säule; **5**: Zellextrakt von GF3 pALP1; **6**: Reinigung über eine Heparinsäule; **7**: Reinigung über eine DNA-Cellulose-Säule. Das Gel wurde mit Silber gefärbt.

Die H-NS-Bande, die bei einer Größe von 15 kDa läuft, ist als deutliche Bande im Zellextrakt erkennbar. Für das H-NS-Protein werden zwei Möglichkeiten der Reinigung gezeigt. Nach dem gleichen ersten Reinigungsschritt über eine Heparinsäule (Spur 2) werden die Fraktionen mit dem höchsten H-NS-Anteil nach dem Dialysieren entweder erneut auf eine gespülte Heparin- (Spur 3) oder eine DNA-Cellulose-Säule (Spur 4) aufgetragen. Durch die zweite Reinigung über die Heparinsäule wird zwar eine Aufkonzentrierung erreicht, jedoch keine höhere Reinheit. Mit der DNA-Cellulose wird reines Protein erhalten, das nach weiterer Aufkonzentrierung für die Gel-retardierungsexperimente einsetzen läßt. Das gleiche gilt auch für das Protein H-NS224, mit der Heparinsäule (Spur 6) wird eine Vorreinigung erreicht und mit der anschließenden Reinigung über die DNA-Cellulose-Säule (Spur 7) erhält man reines H-NS224. Die Ausbeute aus 10 l MMA-Medium mit Zusätzen beträgt für H-NS 10 mg, für H-NS224 5 mg Protein.

Das unterschiedliche Laufverhalten der Proteine H-NS und H-NS224 ergibt sich aufgrund von Faltungsunterschieden, die Größe der Proteine unterscheidet sich nicht (Perraud, 1994). Die Aminosäure Prolin, die durch den Aminosäureaustausch anstelle eines Leucins in das Protein eingebaut wird, wirkt als Helixbrecher (Creighton, 1993), wodurch die Proteinstruktur in erheblichem Maß beeinträchtigt wird, daß es zu dem veränderten Laufverhalten kommt.

3.2.3 Reinigung der Proteine H-NS210 und H-NS229

Für die Reinigung der Proteine H-NS210 und H-NS-229 wurden Zellen der Stämme JML10 bzw. ALP3 (Tab. 6) in dreimal 5l DYT gezogen, geerntet und aufgeschlossen. Durch Zugabe von gesättigtem Ammoniumsulfat wurde ein Teil der Proteine ausgefällt. Nach dem Dialysieren wurde

das Zellextrakt in Portionen auf die Heparinsäule gegeben. Und die reinsten Fraktionen für den Auftrag auf die DNA-Cellulose-Säule weiter verwendet.

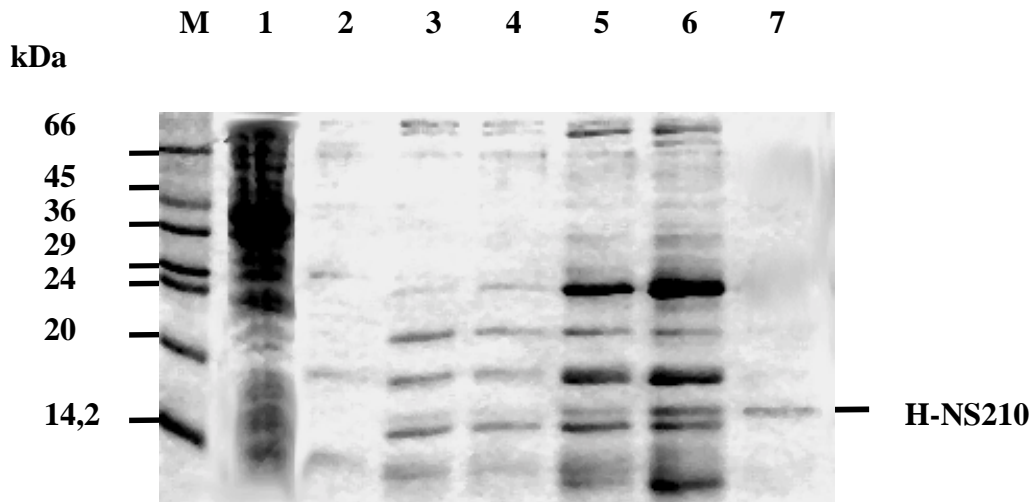


Abb. 19: Proteinreinigung von H-NS210 aus JML10

Spuren **M**: low weight marker; **1**: Zellextrakt von JML10; **2-6**: Reinigung über eine Heparinsäule; **2**: Elution mit 200 mM NaCl; **3+4**: Elution mit 400 mM NaCl; **5+6**: Elution mit 700 mM NaCl; **7**: Reinigung über eine DNA-Cellulose-Säule, Elution mit 700 mM NaCl, ankonzentriert durch Centricon10

Sowohl bei 400 mM (Abb. 19, Spur 3+4) als auch bei 700 mM NaCl (Spur 5+6) eluiert H-NS210. Auch wenn man einen Gradienten mit steigender Salzkonzentration anlegt, eluiert das mutierte Protein über weite Abschnitte der angelegten Salzkonzentration. Auch findet man einen großen Teil des Proteins im Durchlauf. Eine geeignete Aufkonzentrierung und Vorreinigung ist dadurch erschwert. Als Vorreinigungssäule wurde ein weiteres Trägermaterial, die Phosphocellulose ausgetestet. Aber auch dieser Reinigungsschritt brachte nicht die gewünschte Vorreinigung. Das auf viele Fraktionen verteilte Protein wurde dialysiert und auf die DNA-Cellulose-Säule gebracht. Die Ausbeute des nicht vollständig reinen Proteins betrug für 15 l DYT 20 µg. Die DNA-Bindefähigkeit dieser H-NS-Mutante ist sehr reduziert.

Analog wie für JML10 wurde der Zellextrakt des Stamms ALP3 aufgearbeitet.

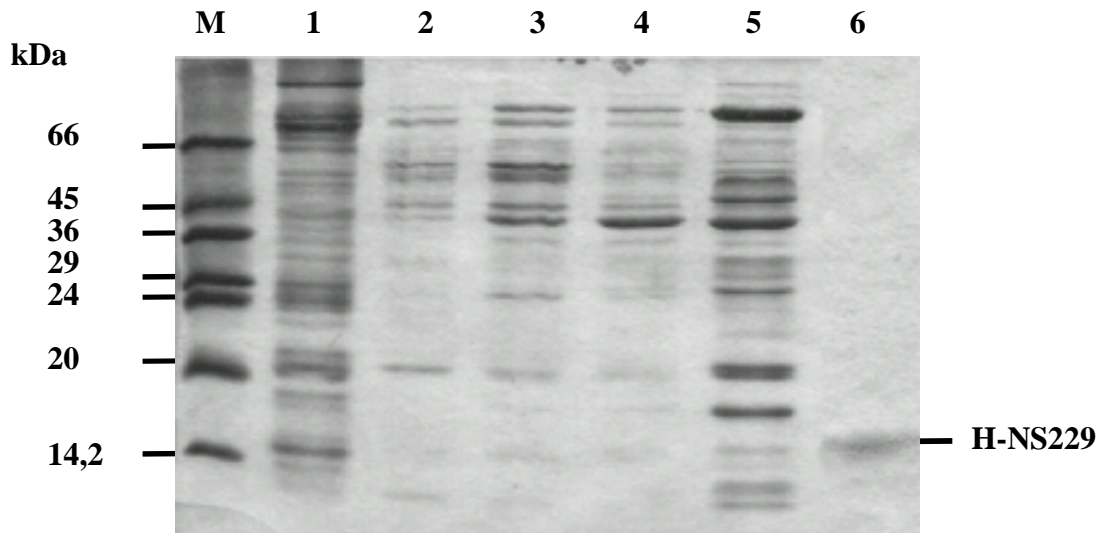


Abb. 20: Proteinreinigung von H-NS229 aus ALP3

Spuren M: low weight marker; 1: Durchlauf der Reinigung über die Heparinsäule; 2-5: Reinigung über eine Heparinsäule; 2: Elution mit 200 mM NaCl; 3+4: Elution mit 400 mM NaCl; 5: Elution mit 700 mM NaCl; 6: Reinigung über eine DNA-Cellulose-Säule, Elution mit 700 mM NaCl

Um deutlich zu machen, daß die größte Menge an H-NS229 nicht an die Säule bindet, wurde anstelle des Zellextraktes, im Unterschied zu der zuvor beschriebenen Reinigung für H-NS210, der Durchlauf des Reinigungsschrittes über die Heparinsäule aufgetragen (Abb. 20, Spur 1). Ähnlich wie für H-NS210 eluiert H-NS229 über die gesamte angelegte Salzkonzentration (Spur 2-5). Die Elution mit der höchsten Salzkonzentration von 700 mM, die noch H-NS229 von der Säule löst (Spur 5), wird nur sehr wenig Protein H-NS229 abgewaschen. In Spur 6 ist das gereinigte Protein nach dem Aufkonzentrieren mit einer Centriconsäule gezeigt. Die DNA-Bindefähigkeit von H-NS229 ist im Gegensatz zu der stark reduzierten DNA-Bindung von H-NS210 noch stärker eingeschränkt.

3.2.4 Bandshifts mit H-NS und H-NS224

Für den Nachweis der direkten Interaktion von H-NS mit DNA, an die H-NS bzw. StpA spezifisch bindet, wurden Gelretardierungsexperimente durchgeführt. Als spezifische DNA wurden Plasmide gewählt die den kompletten *hns*-Promotor (pKS4), den kompletten *stpA*-Promotor (pSK2) bzw. das Strukturgen *proU* (pOS7) tragen. Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, daß die von H-NS spezifisch erkannte Sequenzen auf nur einem Fragment liegen, damit die spezifische Bindung des Proteins an der Retardierung dieses Fragmentes sichtbar werden kann, die anderen Fragmente sollten sich deutlich in ihrer Größe von dem Promotorfragment unterscheiden. Als Proteine wurde gereinigtes Wildtyp-Protein, die Mutante H-NS224 und StpA eingesetzt. Wie aus den Ausführungen ersichtlich war, waren diese Experimente auch für die Punktmutanten H-NS208, H-NS210, H-NS229 und H-NS230 geplant, die Reinigungen ergaben jedoch

so geringe Mengen, daß die Mengen aus einer Reinigung nicht ausreichen, um die Retardierung mit einem der genannten Plasmide mit Protein aus einer Reinigung reproduzierbar zu zeigen.

Wie bereits aus früheren Experimenten bekannt ist, kann H-NS spezifisch an den Promotor von *proU* binden (Lucht *et al.*, 1994; Dersch, 1995). Mit dem Protein H-NS224, der Punktmutante mit dem Aminosäureaustausch Leu30Pro, die auf dem Überexpressionsplasmid pALP1 lokalisiert ist, sollte analog zum Wildtyp das DNA-Bindeverhalten untersucht werden und gezeigt werden, in wie weit der Austausch einer einzigen Aminosäure die molekulare Wirkungsweise des Proteins beeinflußt.

H-NS und H-NS224 lagen gereinigt in adäquater Konzentration vor. Die Plasmid-DNA pOS7 wurde mit *Bgl*I Enzymen geschnitten. Der Restriktionsverdau lieferte sieben verschiedene Fragmente, wovon das 680 bp-Fragment die Promotorregion und die *cis*-regulatorischen Abschnitte enthält. Jeweils 1 µg DNA wurde mit der entsprechenden Menge an Protein inkubiert, was die Vergleichbarkeit der verschiedenen Bandshift-Experimente ermöglichen sollte. Der Auftrennung der Nukleoproteinkomplexe erfolgte auf 1,2 %-igen Agarosegelen.

Abb. 21 stellt im unteren Teil das Bandshift-Experiment der Proteine H-NS (links) und H-NS224 (rechts) dar. Das 680 bp-Fragment, an das H-NS spezifisch bindet, verändert als erstes die Laufhöhe, bei einer Konzentration von 0,05 µg Protein. Mit steigender Proteinkonzentration bindet H-NS unspezifisch an die 577 bp und 1029 bp langen Fragmente. Diese Fragmente enthalten das *bla* Gen und große Abschnitte der *proU-lacZ* Fusion. Dann bindet das H-NS an das kürzeste Fragment und zuletzt, wenn Konzentrationen größer als 0,8 µg eingesetzt wurden, auch an die beiden längsten Fragmente. Die Komplexe, die sich bei den beiden größten eingesetzten Menge bilden, sind zu groß, daß sie kaum noch im Gel laufen. Vorstellbar ist, daß sich ähnliche Strukturen ausbilden, wie wenn H-NS als Genomorganisator aktiv ist.

Bei H-NS224 beginnt das *proU* Promotorfragment erst bei viel höheren Konzentrationen an Protein seine Lage zu wechseln, erst bei einer Inkubation von 0,42 µg Protein beginnt, die spezifische Bande zu verschwinden. Die Promotorregion wird erkannt, aber erst eine größere Menge an Protein ermöglicht es, daß die Bindestellen an der DNA effektiv besetzt werden können und die Bindungen der einzelnen Proteine untereinander, die zu der Ausbildung des Nukleoproteinkomplexes führen, ausgebildet werden können. Genau wie auch bei dem Experiment mit dem Wildtypprotein ist bei höheren Konzentrationen an H-NS224 unspezifische Bindung festzustellen. Die Reihenfolge, mit der die verschiedenen anderen Banden verschwinden, ist die gleiche, wie bei H-NS. Die Unterscheidung von spezifischen Bindestellen im Promotorbereich von *proU* von unspezifischen Regionen der Plasmid-DNA ist also weiterhin gegeben.

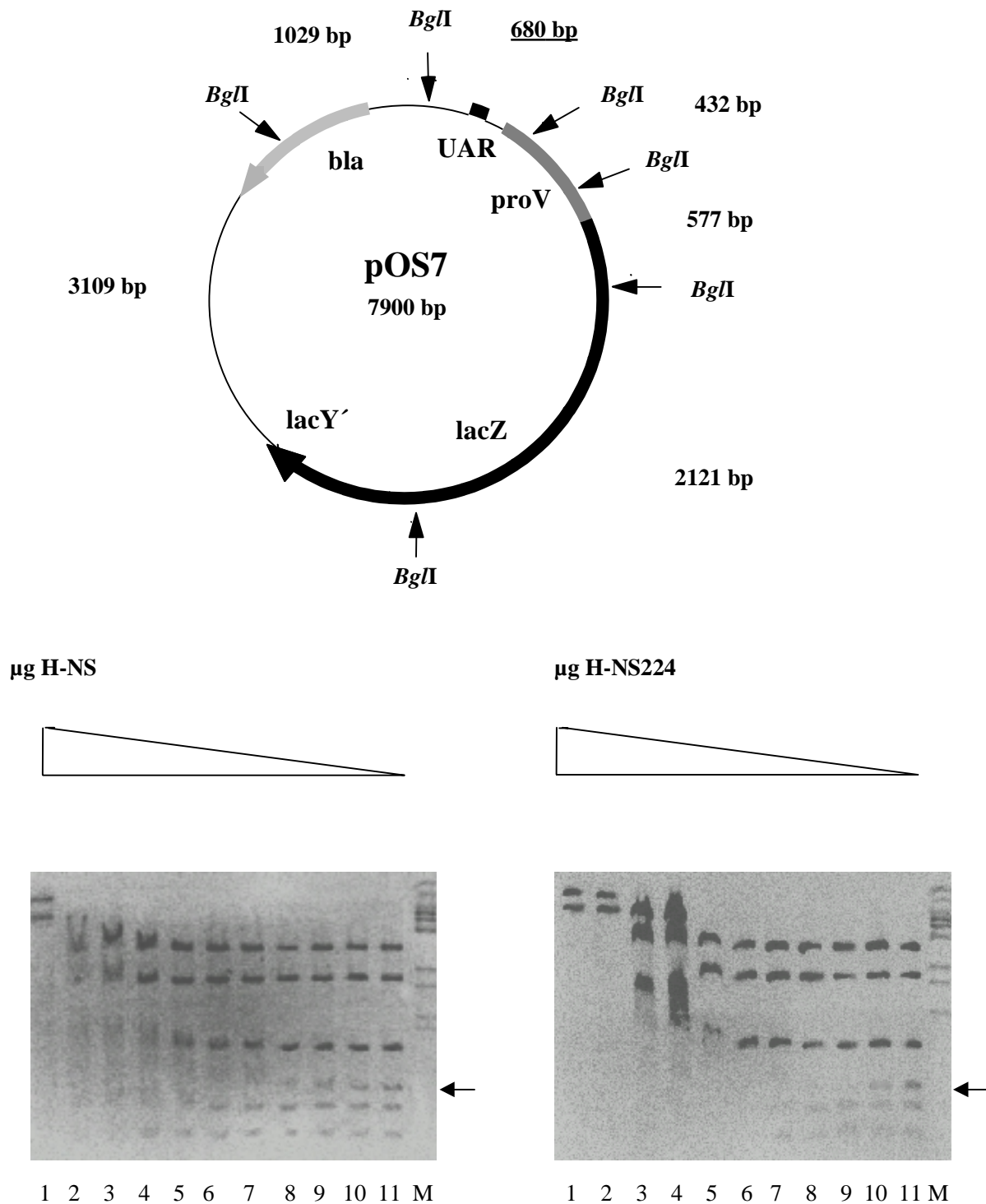


Abb. 21: Interaktion von gereinigtem H-NS bzw. H-NS224 mit dem Promotorfragment von *proU*

Oben ist das Plasmid, aus dem das 680 bp-Promotorfragment stammt, dargestellt. Es werden die Fragmentgrößen gezeigt, die aus dem Verdau mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II resultieren. Unten sind die Gelretardierungsexperimente mit H-NS (rechts) und mit H-NS224 (links) gezeigt. Der Pfeil indiziert das *proU* Promotorfragment. Die Spuren wurden mit 1 µg Plasmid-DNA und mit steigende Proteinkonzentrationen beladen.

H-NS: Spuren 1: 5 µg Protein; 2: 1 µg Protein; 3: 0,8 µg Protein; 4: 0,6 µg Protein; 5: 0,42 µg Protein; 6: 0,24 µg Protein; 7: 0,13 µg Protein; 8: 0,08 µg Protein; 9: 0,05 µg Protein 10: 0,02 µg Protein; 11: 0 µg Protein

H-NS224: Spuren 1: 5 µg Protein; 2: 2 µg Protein; 3: 1,5 µg Protein; 4: 1 µg Protein; 5: 0,9 µg Protein; 6: 0,82 µg Protein; 7: 0,75 µg Protein; 8: 0,56 µg Protein; 9: 0,42 µg Protein 10: 0,315 µg Protein; 11: 0 µg Protein

3.2.5 Bandshifts mit dem H-NS-Paralog StpA

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, teilen H-NS und das Paralog StpA strukturelle und physiologische Eigenschaften. Auch einen Teil ihrer Funktionen können die Proteine gegenseitig übernehmen, das heißt, daß beide Proteine gleiche Promotorregionen im Genom von *E. coli* erkennen und dort binden können. Auch gab es Hinweise, daß StpA, wie auch H-NS, die Expression des eigenen Gens reguliert (Dersch *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996). Die Bindung eines Proteins an den Promotor des jeweilig anderen, verwandten Proteins ist dann ein weiterer Hinweis auf eine gegenseitige Kontrolle.

In Bandshift-Experimenten der beiden Proteine im direkten Vergleich soll die Interaktion von H-NS und StpA an den gleichen Promotoren demonstriert werden. So werden Plasmide, welche die Promotoren der Gene *hns*, *stpA* und des *proU* tragen, mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten, damit, wie zuvor für das Plasmid pOS7 beschrieben, die regulatorischen Regionen, an die spezifische Bindung stattfindet, auf einem Fragment liegen.

In Abb. 22 (unten) wird das Plasmid pKS4 mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Hinc*II verdaut, wodurch sich sechs Fragmente ergeben, wobei zwei Fragmente gleich groß sind und auf gleicher Höhe laufen. Wird zu der geschnittenen DNA eines der beiden Proteine gegeben, kann man ein deutlich verschiedenes Bindeverhalten diagnostizieren. H-NS bindet schon bei einer sehr geringen Konzentration, schon bei einer Konzentration oberhalb 0,18 µg Protein hat die spezifisch bindende 530 bp-Bande ihren Platz verlassen, bei der Inkubation mit StpA ist das erst bei einer Proteinmenge von 0,24 µg. Weiterhin fällt auf, daß die Zugabe von H-NS zu unspezifischen Bindungen führt, wodurch zuerst die 4500 bp-Bande, die die Tetracyclinresistenz-Cassette trägt, und anschließend das 430 bp, die beiden 620 bp-, das 1800 bp-Fragmente verschwinden. Bei dem Gelretardierungsexperiment verändern die 1800 bp und die 620 bp-Banden mit steigender Proteinkonzentration die Lage, bei Konzentrationen über 0,42 µg StpA wird auch die 4500 bp- Bande retardiert. Die Bindung von StpA scheint selektiver zu sein.

In Abb. 23 wird das analoge Experiment mit der *stpA* Promotorregion gezeigt. Mit genau den gleichen Restriktionsenzymen wird das Plasmid pSK2 geschnitten, es entsteht exakt die gleiche Anzahl von Fragmenten, das Promotorfragment ist jedoch nur 440 bp lang, im Unterschied zu 530 bp bei pKS4. Wie auch pKS4 ist es aus einem pGP-Derivat abgeleitet, anstelle des *hns* Gens ist das *stpA* Gen vor die *lacZ*-Fusion gesetzt worden. Hier stellt sich die Situation umgekehrt dar. Mit H-NS wird eine Retardierung der spezifischen Promotorbande von 440 bp erst mit einer Konzentration von 0,42 µg erreicht, StpA benötigt eine sehr viel geringere Menge von nur 0,24 µg, um die Bande komplett zu binden und sie während der Auftrennung deutlich die Lage wechseln zu lassen. Wie auch schon bei dem Experiment mit dem Plasmid pKS4 zu beobachten war, ist auch hier nur H-NS bei steigender Konzentration zunehmend unspezifisch zu binden. In Spur 3 ändert die 4500 bp-Bande, in Spur 1 auch die beiden 430 bp- und 1800 bp-Fragmente ihre Lage. Bei den entsprechenden Konzentrationen von StpA ist nur eine Veränderung des Laufverhaltens der 4500 bp-Bande festzustellen. Wie die beiden voran gegangenen Experimente zeigen, binden die beiden DNA-Bindeproteine die jeweils eigene Promotorregion spezifisch und

benötigen für eine sichtbare Retardierung geringere Mengen. Außerdem ist das Paralog in der Lage, diesen regulatorischen Bereich auch zu erkennen und spezifisch zu binden.

In Abb. 24 ist ein weiteres Retardierungsexperiment gezeigt. Hier jedoch wird nicht die jeweils spezifische Regulation der eigenen Synthese untersucht, sondern die Interaktion mit dem Promotorbereich von *proU*, wie schon im Zusammenhang mit H-NS224 beschrieben.

Im direkten Vergleich wird offensichtlich, daß H-NS spezifischer an das 680 bp-Fragment bindet. Wie bereits in Abb. 21 beschrieben, reicht eine Proteinmenge von 0,05 µg aus um die Promotorbande zu retardieren (Spur5), StpA erreicht die Retardierung mit einer Menge von 0,18 µg. Auch reicht für H-NS Mengen weit unterhalb 1µg aus, um auch unspezifische Bindungen mit anderen Fragmenten ein zu gehen, schon bei 0,56 µg sind alle Fragmente bis zu einer Größe von 1029 bp in ihrer Lage geändert. StpA bindet bei doppelter Proteinmenge (Spur 1, rechts) im Vergleich zu H-NS (Spur 1, links) nur an die 577 bp- und das 1029 bp-Fragment. An das 432 bp-Fragment, an das nach den oben genannten Fragmenten mit nächster Priorität gebunden wird, bindet StpA bei der eingesetzten Proteinkonzentration noch nicht.

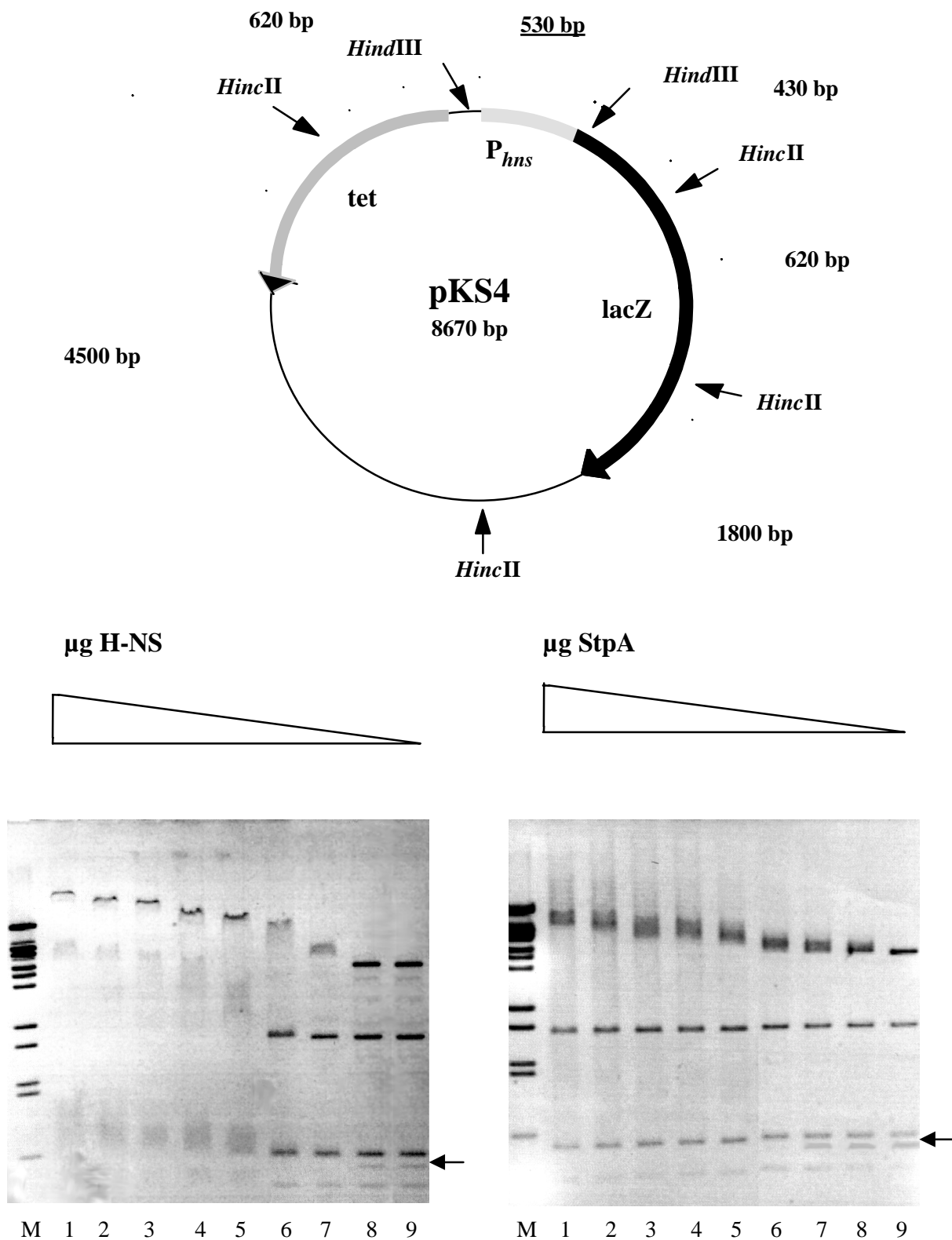


Abb. 22: Interaktion von gereinigtem H-NS bzw. StpA mit dem Promotorfragment von *hns*

Oben ist das Plasmid, aus dem das 530 bp lange *hns*-Promotorfragment stammt, dargestellt. Es werden die Fragmentgrößen gezeigt, die aus dem Verdau mit den Restriktionsenzymen *Hinc*II und *Hind*III resultieren. Unten sind die Gelretardierungsexperimente mit H-NS (links) und mit StpA (rechts) gezeigt. Der Pfeil indiziert das *hns* Promotorfragment. Die Spuren wurden mit 1 µg Plasmid-DNA und mit abfallenden Proteinkonzentrationen beladen. Spuren 1: 5 µg Protein; 2: 1 µg Protein; 3: 0,75 µg Protein; 4: 0,56 µg Protein; 5: 0,42 µg Protein; 6: 0,32 µg Protein; 7: 0,24 µg Protein; 8: 0,18 µg Protein; 9: 0 µg Protein

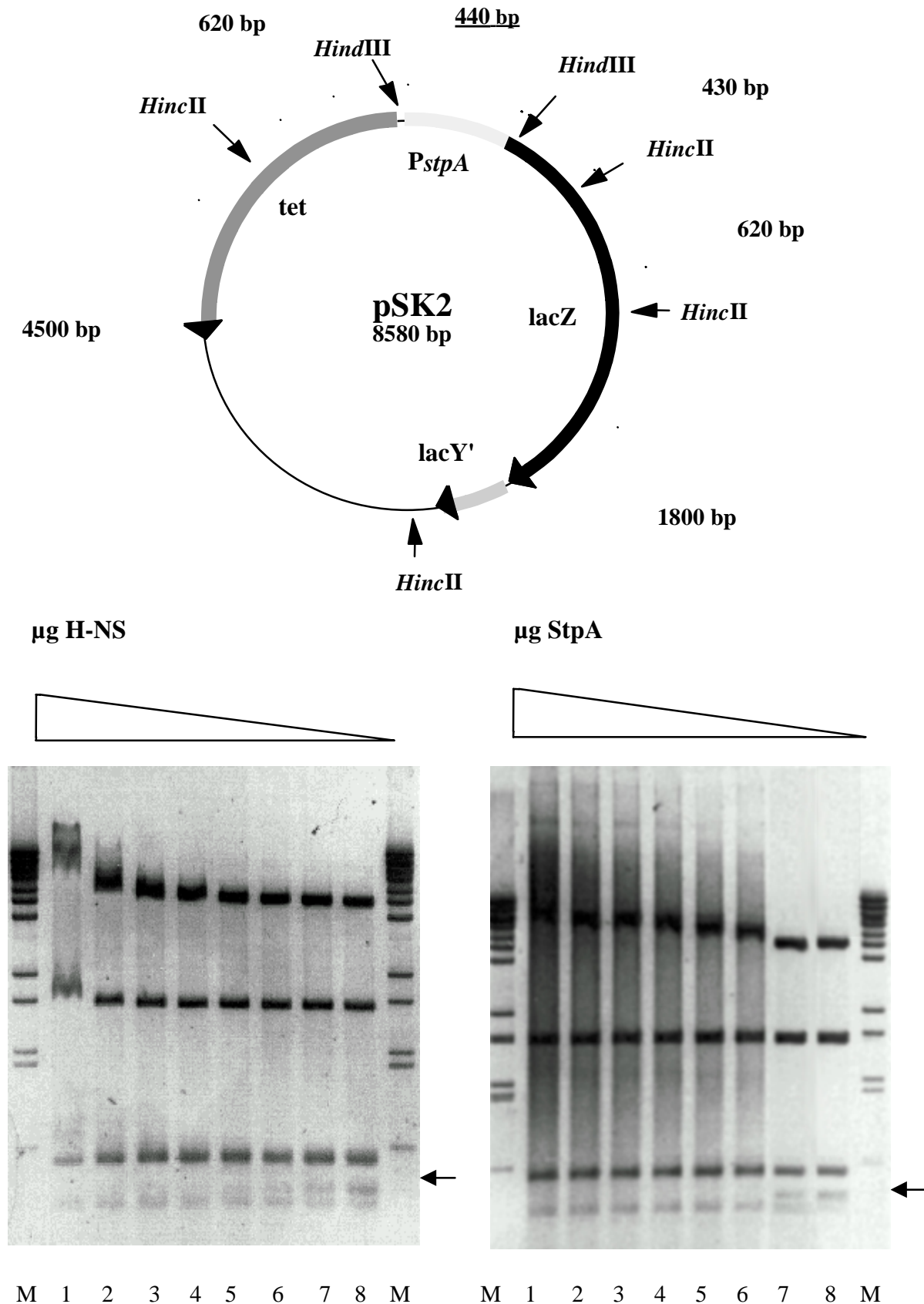


Abb. 23: Interaktion von gereinigtem H-NS bzw. StpA mit dem Promotorfragment von *stpA*

Oben ist das Plasmid, aus dem das 440 bp lange *stpA*-Promotorfragment stammt, dargestellt. Es werden die Fragmentgrößen gezeigt, die aus dem Verdau mit den Restriktionsenzymen *Hinc*II und *Hind*III resultieren. Unten sind die Gelretardierungsexperimente mit H-NS (links) und mit StpA (rechts) gezeigt. Der Pfeil indiziert das *stpA* Promotorfragment. Die Spuren wurden mit 1 µg Plasmid-DNA und mit abfallenden Proteinkonzentrationen beladen. Spuren 1: 1 µg Protein; 2: 0,75 µg Protein; 3: 0,56 µg Protein; 4: 0,42 µg Protein; 5: 0,32 µg Protein; 6: 0,24 µg Protein; 7: 0,18 µg Protein; 8: 0 µg Protein

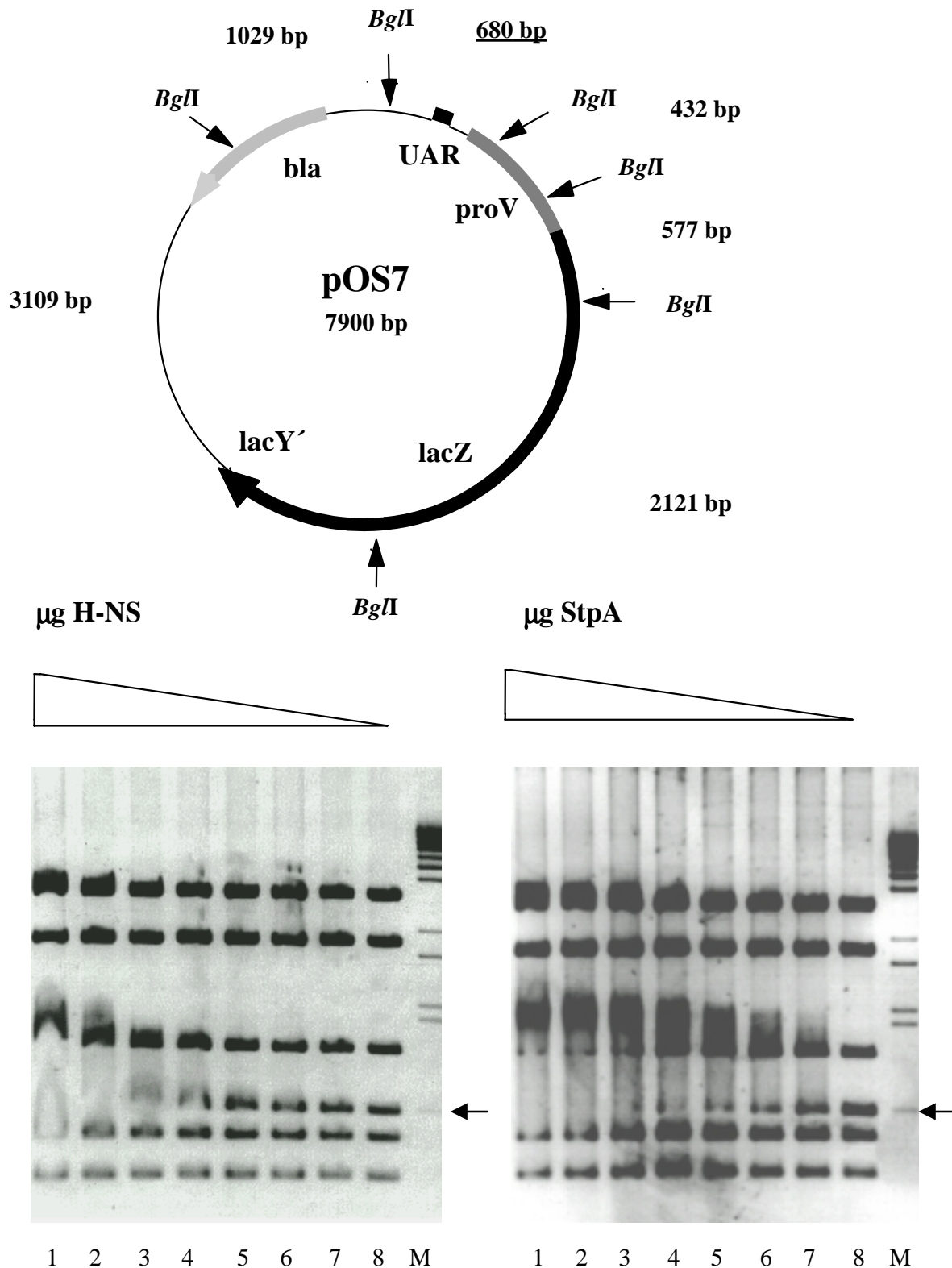


Abb. 24: Interaktion von gereinigtem H-NS bzw. StpA mit dem Promotorfragment von *proU*

Oben ist das Plasmid, aus dem das 680 bp-Promotorfragment stammt, dargestellt. Es werden die Fragmentgrößen gezeigt, die aus dem Verdau mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II resultieren. Unten sind die Gelretardierungsexperimente mit H-NS (links) und mit StpA (rechts) gezeigt. Der Pfeil indiziert das *proU* Promotorfragment. Die Spuren wurden mit 1 μg Plasmid-DNA und mit abfallenden Proteinkonzentrationen beladen. **H-NS:** Spuren 1: 0,56 μg Protein; 2: 0,42 μg Protein; 3: 0,24 μg Protein; 4: 0,18 μg Protein; 5: 0,05 μg Protein; 6: 0,03 μg Protein; 7: 0,02 μg Protein; 8: 0 μg Protein **StpA:** Spuren 1: 1 μg Protein; 2: 0,75 μg Protein; 3: 0,56 μg Protein; 4: 0,42 μg Protein; 5: 0,32 μg Protein; 6: 0,24 μg Protein; 7: 0,18 μg Protein; 8: 0 μg Protein

3.3 Autoregulationsverhalten verschiedener *hns*-Punktmutanten

Wie aus vorangegangenen Arbeiten (Göransson *et al.*, 1990; Hulton *et al.*, 1990; May *et al.*, 1990) bekannt ist, ist die intrazelluläre Konzentration an H-NS entscheidend für die Physiologie der Zelle. Die Expression von *hns* ist daher streng reguliert. Weil Änderungen in der Menge einen drastischen Einfluß auf die Zellfunktionen hat, lag es nahe, daß *hns* die Expression seines eigenen Genproduktes kontrolliert (Dersch *et al.*, 1993; Dersch, 1995). So ist die Synthese negativ autoreguliert. Analog wie für den Wildtyp, sollte auch für die Punktmutanten JML7, JML10, ALP3 und ALP4 untersucht werden, inwiefern die Punktmutanten noch in der Lage sind, die Expression des eigenen Genproduktes zu steuern.

Dazu wurde versucht, in die oben genannten Stämme anstelle der darin integrierten *proU-lacZ* Fusion mittels P1*vir*-vermittelter Transduktion, eine *hns-lacZ* Fusion zu integrieren. Jedoch ließ sich die Fusion nicht durch eine *proU::Spec*-Cassette ersetzen, so daß auch der Folgeschritt, die P1*vir*-vermittelter Transduktion einer *hns-lacZ* Fusion mit einem sehr frühen Fusionspunkt, nicht ausführen ließ. Anstelle wurde mit Western Blots die Menge an H-NS innerhalb von Ganzzell-extrakten der oben genannten Stämme im Vergleich zum Wildtypstamm MC4100 bestimmt sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase. Hierzu wurden von den Stämmen LB-Kulturen bis zur entsprechenden OD₅₇₈ gezogen, die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Von diesem Zellextrakt wurde, nachdem die Gesamtmenge an Protein bestimmt worden war, für MC4100 und JML10 die gleiche Proteinmenge eingesetzt und davon eine Verdünnungsreihe in zweier Stufen hergestellt. Auf ein SDS-Gel wurden für die jeweils zu vergleichenden Stämme die gleiche Menge an Gesamtzellprotein aufgetragen.

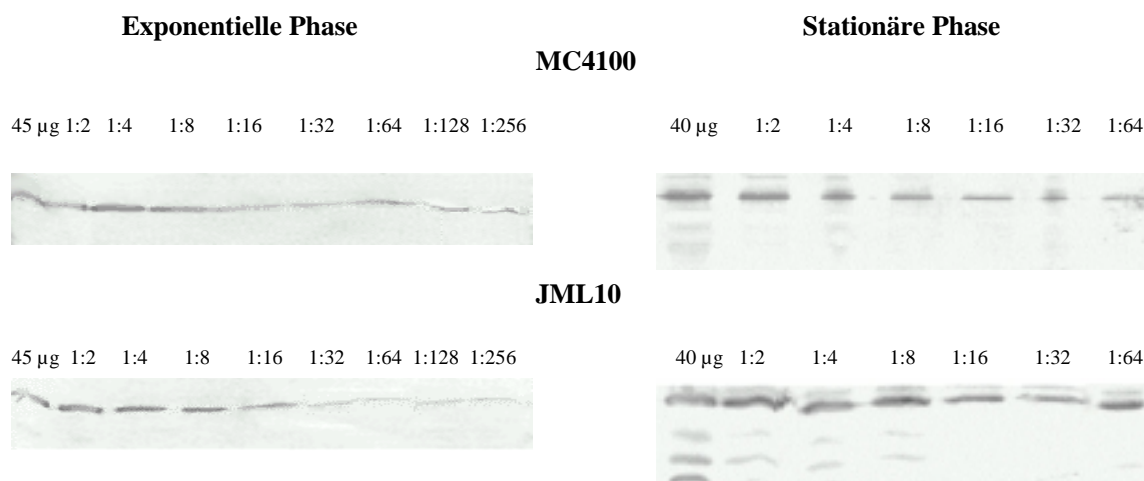


Abb. 25: Vergleich der H-NS-Menge von MC4100 und JML10

Für den Western Blot von Ganzzellextrakten exponentiell bzw. stationär wachsender Zellen von MC4100 und JML10 wurde eine Proteinmenge von je 45 µg bzw. 40 µg Gesamtprotein eingesetzt und in zweier Schritten verdünnt. Die Stämme wurden in LB gezogenen.

Nach dem Blotten wurden mit dem H-NS-Antikörper die jeweiligen Mengen nachgewiesen. Exemplarisch für die anderen Stämme mit chromosomaler Punktmutation wird hier nur der Vergleich von MC4100 und JML10 gezeigt, die anderen Punktmutanten verhielten genauso (Abb. 25).

Aus dem Mengenvergleich wird ersichtlich, daß sich die Mengen an H-NS in dem Wildtypstamm und der Mutante in der exponentiellen Wachstumsphase nicht signifikant unterscheiden. In der stationären Phase ist ein deutlicher Mengenunterschied zu erkennen, wobei die Mutante die höhere H-NS-Menge aufweist. Es braucht also eine gewisse Wachstumszeit, daß sich dieser Phänotyp ausprägen kann und Protein akkumulieren kann. Diese Beobachtung legt nahe, daß sich das mutierte *hns210* Allel in JML10 nur ineffektiv selbst negativ autoreguliert. Durch den Verlust der DNA-Bindefähigkeit ist das mutierte Protein nicht mehr in der Lage die Repression der eigenen Expression effektiv durchzuführen. Jedoch ist der Mengenunterschied nicht so groß, woraus zu schließen ist, daß es aber nicht zum vollkommenen Ausfall der Regulation kommt. Auch sind auf dem Western Blot von H-NS210 mit kürzeren Proteinen deutlich weitere Antikörperbindung zu erkennen, höchst wahrscheinlich handelt es sich um Abbauprodukte des mutierten H-NS-Proteins.

4. Darstellung des DNA-Bindefähigkeit

Eine entscheidende Funktion von H-NS ist die Genomorganisation. Diese Fähigkeit anschaulicher zu machen, sollte mit den mikroskopischen Aufnahmen erreicht werden. Wobei nicht das Protein direkt sichtbar gemacht wird, sondern über den Effekt die Form des Nukleoids zu verändern.

4.1 Mikroskopische Darstellung der Nukleoidkondensation

Um das Nukleoid in der Zelle sichtbar zu machen, bot sich mit DAPI ein Farbstoff an, der selektiv in DNA interkaliert und nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert. Für das Wildtypprotein war bekannt, daß es, wenn es in der Zelle überproduziert wird, zur Kondensation des Nukleoids kommt (Spurio *et al.*, 1992). Immunelektronische Aufnahmen zeigten, daß H-NS vor allem im Nukleoid lokalisiert war. Die Überproduktion bewirkt weiter, daß als sofortige Wirkung RNA- und Proteinbiosynthese zum Erliegen kommen und später in etwas geringerem Ausmaß die DNA-Synthese und Synthese von Zellwandkomponenten beeinflusst wird. Die Zelle wird künstlich in einen Zustand der stationären Phase versetzt (McGovern *et al.*, 1994). Die Form des Nukleoid im kondensierten Zustand ist nahezu vollständig kugelig. Mit diesem Nachweis war ein direkter Beweis der Funktion als Organisator des Genoms *in vivo* erbracht, weiter ließen diese Beobachtungen zu, auch weitere Funktionen in der Genregulation auf Transkriptions- und Translationsebene anzunehmen. Es war jetzt von Interesse zu untersuchen, welche Abschnitte von dem Wildtypprotein für die Bindung an das Nukleoid und die daraus folgende Kondensierung erforderlich sind. Die Überproduktion erfolgte in dem IPTG-induzierbaren T7-

RNA-Polymerasesystem, mit Plasmiden, die sich von pPD100 ableiten. Hierzu wurde in den Überexpressionsvektor die mit PCR amplifizierten *hns*-Derivate von JML7, JML10, ALP3 und ALP4 in pPD100 gebracht. Weiter wurden Plasmide aus Vorarbeiten (Dersch *et al.*, 1994) verwendet, die C-terminal verkürztes H-NS produzieren (Abb. 26, oben).

4.2 Vergleich der Verhältnisse von Zell- und Nukleoiddurchmesser von *hns*-Stämmen mit Stämmen verschiedener *hns*-Derivate

Die Überproduktion der verschiedenen H-NS-Proteine erfolgte, wie zuvor schon für die Reinigung beschrieben, in dem *hns206*-Stamm GF3 mit dem korrespondierenden Plasmid in Minimalmedium. Abweichend davon wurde nur die Chloramphenicol-Konzentration reduziert, die für die Stabilität des Plasmids in dem Stamm notwendig ist, um Effekte dieses Antibiotikums auf die Nukleoidstruktur auszuschließen. Anstelle einer Konzentration von 50 µg/ml wurden nur 30 µg/ml verwendet. Über Chloramphenicol, das in Eukaryonten als Inhibitor der Proteinbiosynthese eingesetzt wird, ist bekannt, daß es die Zellteilung einzuleiten und zur Kondensation des Nukleoids führen kann (Zusman *et al.*, 1973; van Helvoort *et al.*, 1996). Um diesen Effekt für das Experiment auszuschließen, wurde vorher der Einfluß von Chloramphenicol ausgetestet. Es wurden Kulturen mit unterschiedlichen Chloramphenicol-Konzentrationen gezogen, wobei das Antibiotikum immer schon vor dem Animpfen vorgelegt wurde und Kulturen, in denen kurz vor der Ernte zusätzlich das Antibiotikum in der Menge von 100 µl/ml zugegeben wurde. Nur in den letzt genannten Ansätzen (Daten nicht gezeigt) konnte man durch die Zugabe von Chloramphenicol einen Effekt beobachten. Wenn das Antibiotika von Anfang an mit einer Konzentration von 50 µg/ml und kleiner eingesetzt wird, sind keine Chloramphenicol bedingten Veränderungen zu beobachten.

Bei einer OD₅₇₈ von 0,5 wurden die Kulturen geteilt und die Proteinproduktion in einer von beiden mit IPTG induziert. Nach einer Induktion von zwei Stunden wurden die Zellen geerntet. Mit einer physiologischen NaCl-Lösung gewaschen und die Kulturen auf dem einem Objektträger Luft getrocknet und fixiert. Die so vorbereiteten Präparate wurden gefärbt, zuerst die FITC- danach die DAPI-Färbung. Die Objekte wurden mit Hilfe des Laserscanning-Mikroskop betrachtet und dokumentiert. Von jedem Präparat wurden eine Reihe von Aufnahmen aus verschiedenen Ausschnitten gemacht, damit für Vermessung der Zell- und Nukleoidgröße mindestens 30 Zellen vermessen werden konnten.

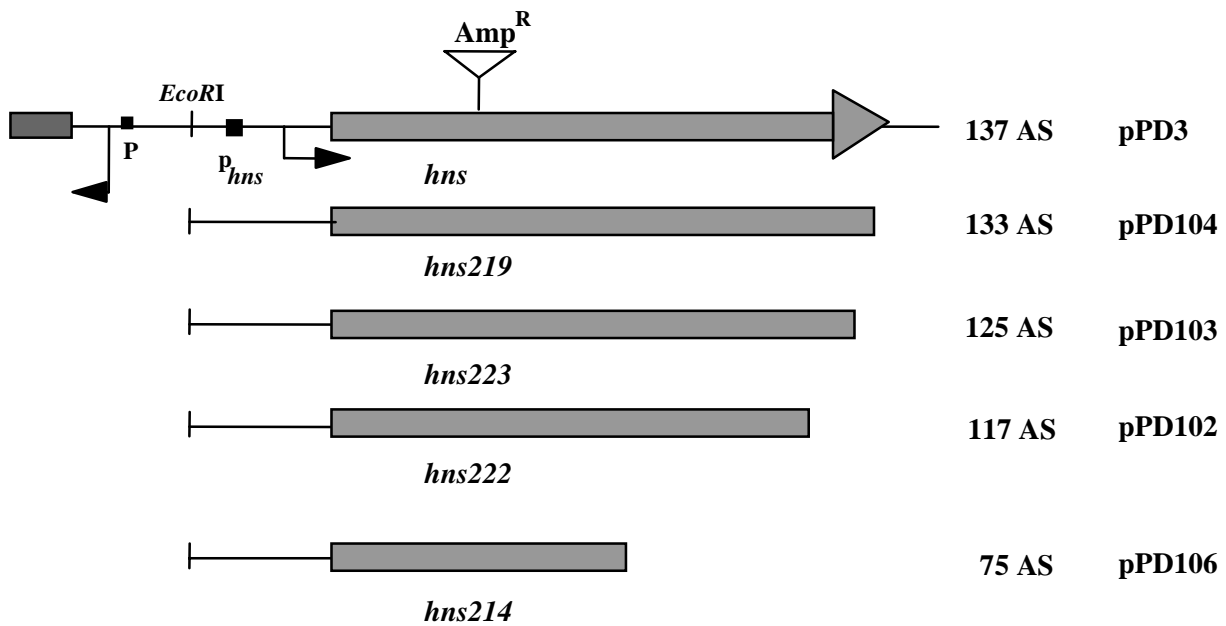


Abb. 26: C-terminal verkürzte H-NS-Derivate

Angegeben ist jeweils die Anzahl der Aminosäuren des Strukturgens (links) und der Name des Plasmids (äußerst links), auf dem die verkürzten H-NS-Fragmente vorliegen.

Ein Teil der Kultur wurde für den Auftrag auf ein Proteingel aufbereitet zur Kontrolle der Überproduktion (Abb. 27).

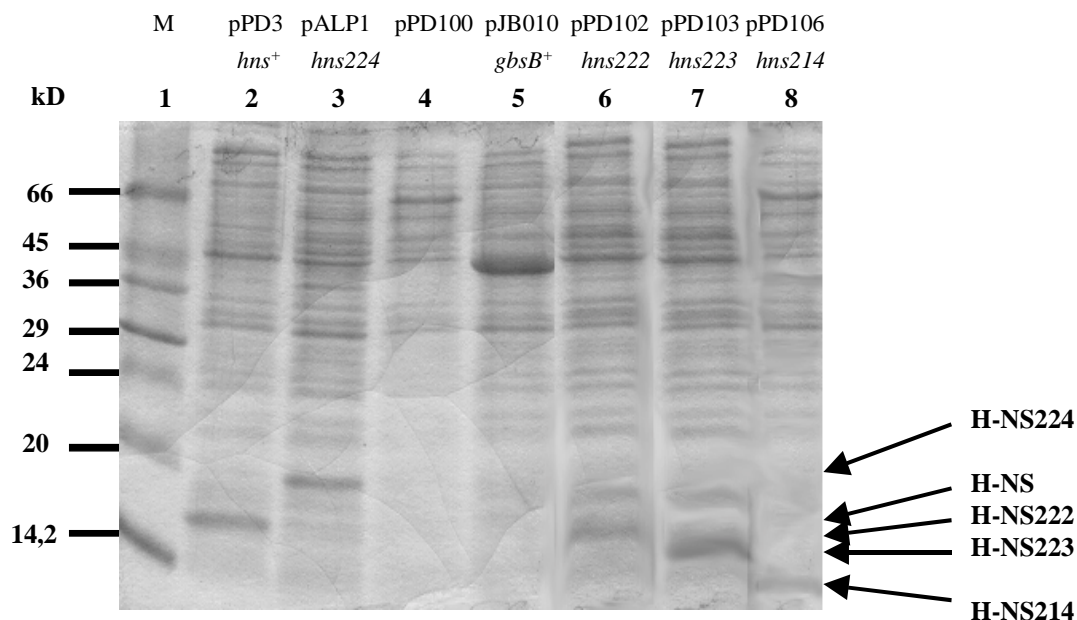


Abb. 27: Kontrolle der Überproduktion

Die Überproduktionen wurden in dem Stamm GF3 *hns206* in Minimalmedium durchgeführt. Induktion erfolgte bei einer OD_{578} von 0,5. Gezeigt sind eine Auswahl der induzierten Proben, die für die Mikroskopie verwendet wurden. Als Negativkontrollen diente die der leere Vektor pPD100 (Spur 4), der kein H-NS synthetisiert und das Plasmid pJB010 (Spur 5), das die Alkoholdehydrogenase GbsB von *B. subtilis* kodiert. Spur 2 zeigt das H-NS-Wildtyp-Protein, die Spuren 3 und 6-8 zeigen die Proteine mit einem Aminosäureaustausch.

Wie erwartet ist die Spur 4 mit dem leeren Vektor pPD100 die einzige Spur, in der kein Protein überproduziert wurde, in allen anderen Spuren ist eine Proteinbande sichtbar. In Spur 2 ist das H-NS-Protein in einer deutlichen Bande zu sehen, ebenso sichtbar sind die Banden von den verschiedenen mutierten H-NS-Proteinen (Spur 3 und 6-8). Auch das Protein GbsB (Spur 5) wird in deutlichen Mengen überproduziert. Die Proteinmenge der gezeigten Banden im Proteingel unterscheidet im Western Blot (nicht gezeigt) signifikant von der Proteinmenge, die in einem *hns*-Wildtypstamm durch das chromosomal vorliegende Gen synthetisiert wird.

Als Beurteilungsgrundlage der Veränderung der Zellgröße dient der Vergleich von GF3 (pPD3) ohne und mit induzierter H-NS-Synthese (Tab. 10, oben und Abb. 28).

Tab. 10: Verhältnis von Zell- zu Nukleoidgröße von *hns* und verschiedenen Mutanten

GF3 + Plasmid	Allel	induziert	Zellgröße [µm]	Nukleoidgröße [µm]	Nukleoidgröße/ Zellgröße	Abb.
pPD3	<i>hns</i> ⁺	+	3,6 +/- 0,4	1,2 +/- 0,3	0,4	28, rechts
		-	2,4 +/- 0,4	1,9 +/- 0,4	0,8	28, links
pPD100		+	2,1 +/- 0,7	1,1 +/- 0,3	0,6	29, links
		-	2,6 +/- 0,8	1,3 +/- 0,4	0,5	
pJB010	<i>gbsB</i> ⁺	+	3,4 +/- 1,1	2,4 +/- 0,5	0,7	29, rechts
		-	3,0 +/- 0,8	2,3 +/- 0,4	0,8	
pPD104	<i>hns219</i>	+	2,9 +/- 0,3	0,8 +/- 0,1	0,3	
		-	2,2 +/- 0,8	1,3 +/- 0,1	0,6	
pPD103	<i>hns223</i>	+	3,9 +/- 1,1	1,3 +/- 0,2	0,3	
		-	2,8 +/- 0,5	1,5 +/- 0,6	0,5	
pPD102	<i>hns222</i>	+	4,1 +/- 1,1	1,1 +/- 0,3	0,3	32, rechts
		-	2,0 +/- 0,3	1,2 +/- 0,3	0,6	32, links
pPD106	<i>hns214</i>	+	4,9 +/- 0,9	1,3 +/- 0,3	0,3	31, rechts
		-	2,5 +/- 0,5	1,1 +/- 0,2	0,4	31, links
pALP1	<i>hns224</i>	+	3,1 +/- 0,8	0,8 +/- 0,1	0,3	30, rechts
		-	3,1 +/- 0,7	1,8 +/- 0,4	0,6	30, links
pBZ13	<i>hns233</i>	+	3,7 +/- 0,6	0,8 +/- 0,1	0,2	33, rechts
		-	2,5 +/- 0,6	1,4 +/- 0,3	0,6	33, links
pBZ10	<i>hns230</i>	+	2,8 +/- 0,6	1,0 +/- 0,3	0,4	
		-	2,5 +/- 0,6	1,1 +/- 0,3	0,4	

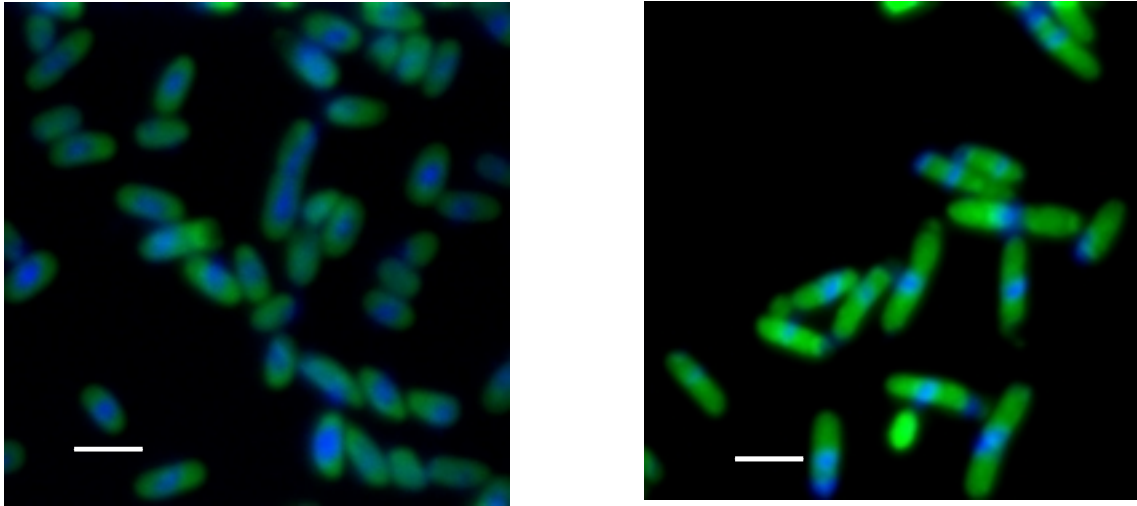


Abb. 28: Nukleoidkondensation in GF3 *hns206* (pPD3) mit dem H-NS Wildtypprotein auf dem Plasmid
Die Aufnahme links zeigt die Kultur ohne IPTG-Zugabe, rechts die mit Überproduktion von H-NS nach Induktion mit IPTG. Die Größenbalken in allen Aufnahmen entsprechen 2 μm .

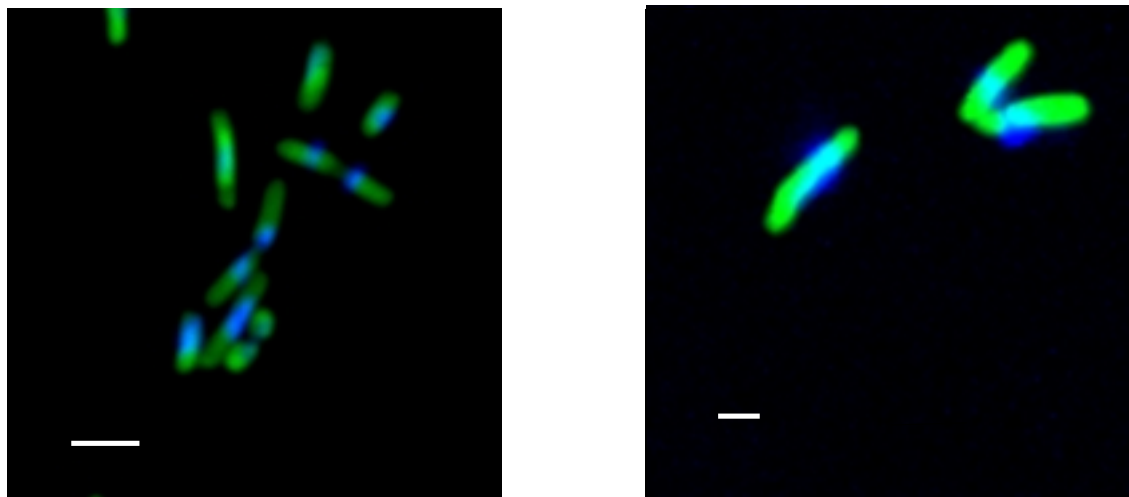


Abb. 29: Darstellung der Kontrollen: GF3 *hns206* (pPD100) und GF3 *hns206* (pJB010)

Die Aufnahmen zeigen jeweils die induzierten Proben. In beiden Kulturen wird kein H-NS überproduziert. In GF3 *hns206* wurde der leere Vektor pPD100 (links) und in im Fall von pJB010 (rechts) ein Plasmid, mit dem GbsB überproduziert wird, das nicht an DNA bindet. Die Zellen zeigen keine kompaktere Nukleoidstruktur.

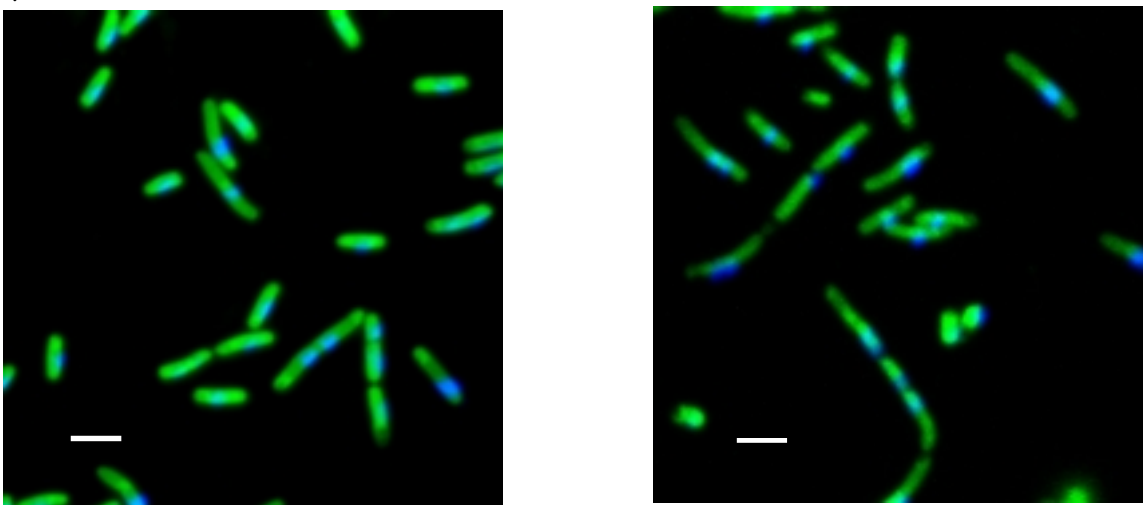


Abb. 30: Veränderte Morphologie der *hns224*-Mutante (pALP1)

Links ist die Kultur von GF3 *hns206* (pALP1) ohne IPTG-Zugabe, rechts die Kultur mit H-NS224-Überproduktion dargestellt. Bei H-NS224 ist an Position 30 ein Leucin durch ein Prolin ausgetauscht.

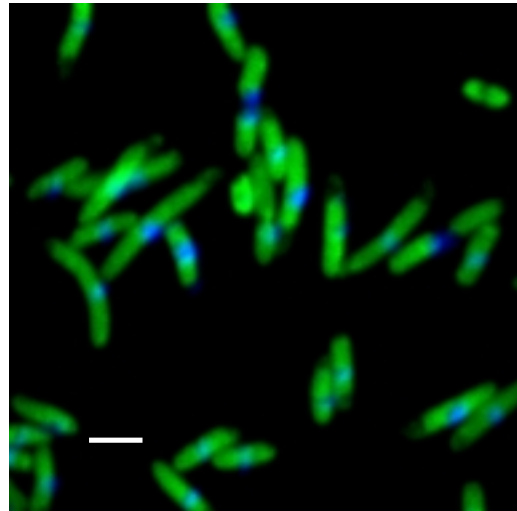
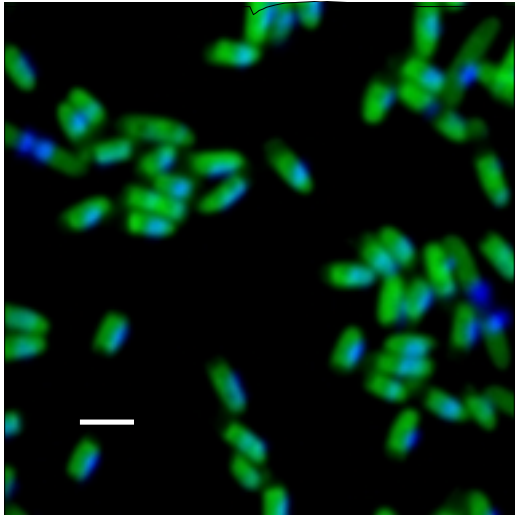


Abb. 31: Nukleoidkondensation in GF3 *hns206* (pPD106)

pPD106 kodiert das 75 Aminosäure lange C-terminal verkürzte *hns*-Fragment (*hns214*)

Die Aufnahme zeigt links die Kultur GF3 *hns206* (pPD106) ohne IPTG-Zugabe, rechts die mit Überproduktion von H-NS214 nach Induktion mit IPTG.

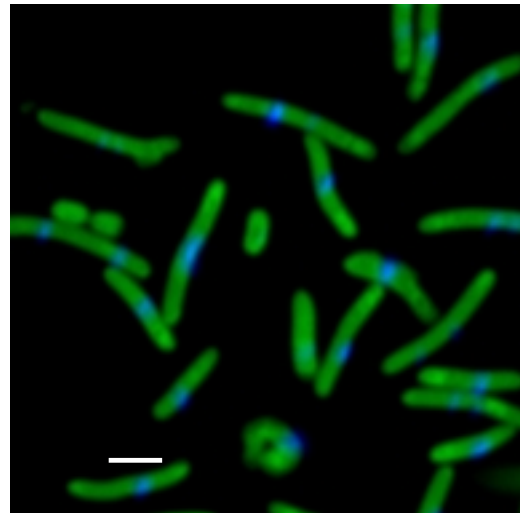
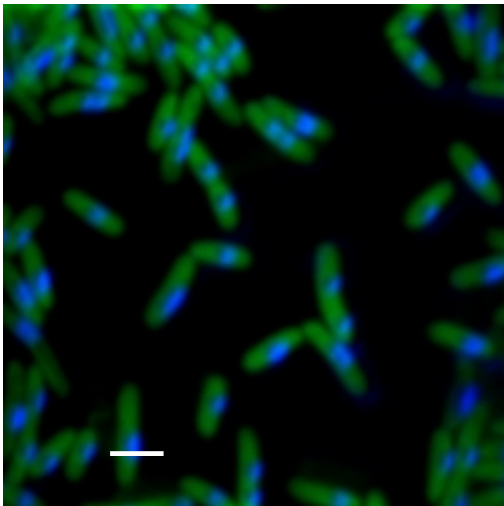


Abb. 32: Nukleoidkondensation in GF3 *hns206* (pPD102)

pPD102 kodiert das 117 Aminosäure lange C-terminal verkürzte *hns*-Fragment (*hns222*)

Die Aufnahme links zeigt die Kultur GF3 *hns206* (pPD102) ohne IPTG-Zugabe, rechts die mit Überproduktion von H-NS222 nach Induktion mit IPTG.

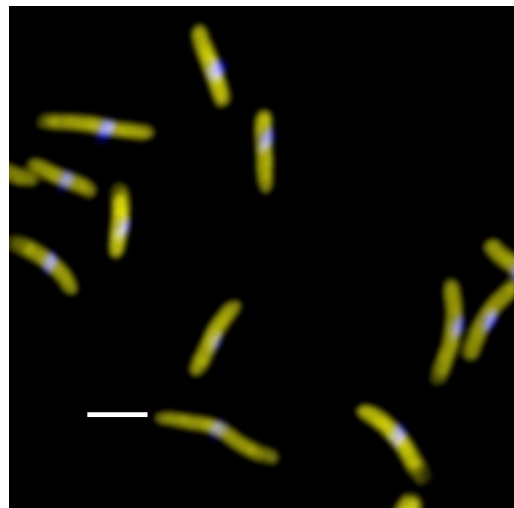
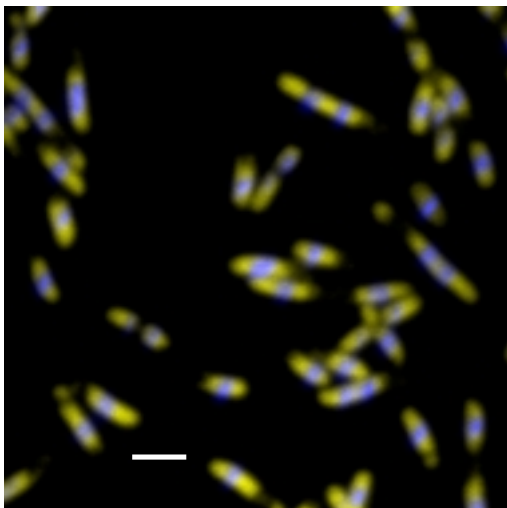


Abb. 33: Nukleoidkondensation in der Mutante mit dem Allel *hns233* (pBZ13)

Die Aufnahme links zeigt die Kultur GF3 *hns206* (pBZ13) ohne IPTG-Zugabe, rechts die mit Überproduktion von H-NS233 nach Induktion mit IPTG. In H-NS233 ist an Position 14 ein Leucin gegen ein Prolin ausgetauscht.

Deutlich ist der Größenunterschied der Zellen zwischen der induzierten und nicht induzierten Kultur zu sehen, wobei die mit IPTG induzierten Zellen zusätzlich ein stärker kondensiertes Nukleoid aufweisen. Ob die Zellvergrößerung als Nebeneffekt der Zugabe von IPTG verursacht wurde, wird durch die beiden Kontrollen klar, GF3 (pPD100) ist der leere Vektor, mit dem kein Protein produziert wird und in GF3 (pJB010) wird das von H-NS in seiner Funktion deutlich verschiedene Protein GbsB aus *Bacillus subtilis* synthetisiert, eine Alkohol-Dehydrogenase des Cholinstoffwechsels, das die Reaktion von Cholin zu Glycin-Betain-Aldehyd katalysiert (Boch *et al.*, 1996). In beiden Fällen füllt das Nukleoid einen größeren Raum in der Zelle aus. Belegt wird das auch durch Messung der Zellgröße und des Nukleoiddurchmessers (Tab. 10).

In der Tabelle sind Zell-, Nukleoidgröße und das Verhältnis aus beiden Maßen eingetragen. Sie sagt somit etwas über die Absolutwerte von Zell- und Nukleoidgröße als auch über das Verhältnis der beiden Werte aus. Ist das Verhältnis zwischen Zell- und Nukleoidgröße groß, nahe 1, füllt das Nukleoid weite Bereiche der Zelle aus, ist dagegen die Relation zwischen beiden Maßen klein, spricht es dafür, daß der Durchmesser des Nukleoids sehr klein ist, es eher kugelig zusammengezogen ist.

Für das Wildtypprotein belegen die Zahlen, daß die Größe der Zellen von der Probe mit der hohen Menge an H-NS gegenüber der Parallelkultur ohne IPTG um 1,2 µm zunimmt, bei gleichzeitiger Abnahme des Nukleoiddurchmessers. Bei der Kultur mit dem leeren Vektor ist keine signifikante Größenzunahme von Zelle und Nukleoid festzustellen. Auch die Beziehung der beiden Maße ist gleich. Im Gegensatz hierzu weist der Stamm mit erhöhter Menge an H-NS ein deutlich kleineres Verhältnis der beiden Größen auf. Mit 0,4, in Relation zu den insgesamt erhaltenen Unterschieden, ist der Wert relativ groß. Auch die andere Kontrolle die Überproduktion von GbsB, ein Protein, das mit der Nukleoidstruktur nichts zu tun hat und auch nicht DNA binden kann, legt dar, daß es sich bei der Nukleoidkondensation, um ein H-NS abhängiges Phänomen handelt. Auch eine Größenzunahme ist hier nicht festzustellen.

Für die C- terminal verkürzten Fragmente ergibt sich aus den Meßwerten, daß vor allem das längste Fragment mit 133 Aminosäuren sich bezüglich der Kondensation ähnlich wie der Wildtyp verhält, jedoch insgesamt nicht die gleichen Größen erreicht. Bei allen im folgenden behandelten Proteinverkürzungen ist eine deutliche Zellvergrößerung zu beobachten. Die 125 und 117 Aminosäuren langen Fragmente (Abb. 32) unterscheiden sich geringfügig von dem Wildtyp, die Differenz der Relation Zell- und Nukleoidgröße ist geringer als beim Wildtyp und dem 133 Aminosäurenfragment. Das kürzeste Fragment mit nur 75 Aminosäuren (Abb. 31) zeigt den Kondensationseffekt nicht mehr offensichtlich, was nicht völlig unerwartet ist, weil der für die DNA-Bindung entscheidende Abschnitt zwischen Position 110 und 115 in dem Protein nicht mehr vorhanden ist.

Die Punktmutationen der *hns224* (Abb. 30) und *hns233* (Abb. 33), die beide für einen Aminosäureaustausch im vorderen Drittel des Proteins codieren sind, bei *hns233* an Position 14 und *hns224* an Position 30, ähneln in ihrer Fähigkeit, das Nukleoid zu kondensieren, dem Wildtyp. Die *hns224*-Mutante zeigt jedoch besonders deutlich eine morphologische Veränderung,

die Zellen können sich nicht nach der Verdopplung des Chromosoms voneinander trennen und bilden lange Fäden. Zum Teil sind die beiden Nukleotide in den langgestreckten Zellen gut zu erkennen. Das Allel *hns230* ist im Unterschied zu den anderen Allelen nicht mehr in der Lage das Nukleoid zu kondensieren, auch hier ist ausschlaggebend, daß die Region zwischen den Aminosäure 110 und 117 von der Punktmutation betroffen ist und sich die Fähigkeit DNA zu binden drastisch reduziert.

Daß die Überproduktion eines Proteins für die Zelle eine starke Belastung ist, wird auch durch das Auftreten von sogenannten kernlosen Zellen deutlich, sehr viel häufiger als in den Parallelkulturen ohne IPTG-Induktion waren diese abgestorbenen Zellen zu erkennen.

5. Phylogenetischer Vergleich verschiedener H-NS-Proteine

Außer denjenigen Aminosäuresequenzen von Organismen, bei denen gezielt nach H-NS gesucht wurde, sind in Datenbanken auch Sequenzen einsehbar, die im Rahmen von Sequenzierung des kompletten Genoms des betreffenden Organismen verfügbar wurden. Der phylogenetische Vergleich verschiedener H-NS-Proteine ergab, daß H-NS bisher nur in der γ -Gruppe der Proteobakterien ein hoher Grad an Homologie erreicht wird. Dort ist es vor allem in der Gruppe der *Enterobacteriaceae* verbreitet, außer bei *Escherichia coli* auch bei den Vertretern *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexeri*, *Serratia macerans*, *Proteus vulgaris* und *Erwinia chrysanthemi*. Weiter ist H-NS auch in *Haemophilus influenza*, der der Familie *Pasteuracellaceae* angehört und zusammen mit der Familie der Enterobacteriaceae in die gleiche Proteobakteriengruppe gehört, beschrieben worden. Unter diesen Vertretern beträgt die Homologie mindestens 80-100 %. Zu dieser hohen Homologie tragen vor allem stark konservierte Abschnitte bei wie die erste Hälfte bis Aminosäure 76 und ein kurzer Abschnitt im hinteren Bereich der Primärsequenz zwischen Aminosäure 100 und 120. Die Region zwischen Aminosäure 77 und 99 weist die größten Abweichungen auf. Auch von der Art der Aminosäureaustausche läßt sich ableiten, daß in dem kurzen Protein jede Aminosäure ihre Funktion hat, auch wenn diese darin besteht, bestimmte Ladungsverhältnisse und innermolekulare Wechselwirkungen aufrecht zu erhalten. Durch Änderungen in der Primärsequenz ergibt daher meist keine Veränderung in der Zusammensetzung von sauren, basisch und aromatischen Aminosäuren, weil im Fall eines Austausches eine Aminosäure aus der gleichen Familie an die Stelle tritt, so daß durch konservative Substitution die Integrität des Proteins in den verschiedenen Bakteriengruppen aufrecht erhalten wird (Dayhoff *et al.*, 1978).

Phylogenetisch weit davon entfernt ist *Mycobacterium tuberculosis* aus der Gruppe der Actinomyceten, bei dem auch ein H-NS-Protein gefunden wurde, das jedoch keine sehr hohe Ähnlichkeit auf Aminosäureebene aufweist, aber dieser Proteingruppe zugeordnet wird (Jungblut *et al.*, 1999; Mollenkopf *et al.*, 1999). Funktionelle Ähnlichkeiten müssen erst noch umfangreicher gezeigt werden. Ansonsten hat man für keine weiteren gram-positiven Bakterien wie *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.*, 1997), *Mycoplasma genitalum* (Fraser *et al.*, 1995) und *M. pneumoniae*

1	M S E A L K I L N N I R T L R A Q A R E C T L E T L E E M L	H-NS <i>Escherichia coli</i>
1	M S E A L K I L N N I R T L R A Q A R E C T L E T L E E M L	H-NS <i>Shigella flexeri</i>
1	M S E A L K I L N N I R T L R A Q A R E C T L E T L E E M L	H-NS <i>Salmonella typhimurium</i>
1	M S E R L K I L N N I R T L R A Q A R E C T L E T L E E M L	H-NS <i>Serratia marcescens</i>
1	M S E A L K I L N N I R T L R A Q A R E C S L E T L E E M L	H-NS <i>Erwinia chrysanthemi</i>
1	M S S A L K I L N N I R T L R A Q A R E T S L E T L E E M L	H-NS <i>Proteus vulgaris</i>
1	M S V M L Q S L N N I R T L R A M A R E F S I D V L E E M L	StpA <i>Escherichia coli</i>
1	M N E L V R G L T N L R S L R A A V R E L T L E Q A E N A L	H-NS <i>Haemophilus influenza</i>
1	M P D P Q D R P D S E P S D A S T P P A K K L P A K K A A K	H-NS <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
31	E K L E V V V N E R R E E E S A A A A E V E E R T R K L Q Q	H-NS <i>Escherichia coli</i>
31	E K L E V V V N E R R E E E S A A A A E V E E R T R K L Q Q	H-NS <i>Shigella flexeri</i>
31	E K L E V V V N E R R E E E S A A A A E V E E R T R K L Q Q	H-NS <i>Salmonella typhimurium</i>
31	E K L E V V V N E R R E E E D S Q A Q A E I E E R T R K L Q Q	H-NS <i>Serratia marcescens</i>
31	E K L E V V V N E R R E E E E N Q A Q A E I E E R T R K L Q Q	H-NS <i>Erwinia chrysanthemi</i>
31	E K L E V V V N E R R E E E E Q A M Q A E I E E R Q Q K L Q K	H-NS <i>Proteus vulgaris</i>
31	E K F R V V T K E R R E E E E Q Q Q R E L A E R Q E K I S T	StpA <i>Escherichia coli</i>
31	E K L Q T A I E E K R A N E A E L I K A E T E R K E R L A K	H-NS <i>Haemophilus influenza</i>
31	K A P A R K T P A K K A P A K K T P A K G A K S A P P K P A	H-NS <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
61	Y R E M L I A D G I D P N E L L N S L A A V K S G T K A K R	H-NS <i>Escherichia coli</i>
61	Y R E M L I A D G I D P N E L L N S L A A V K S G T K A K R	H-NS <i>Shigella flexeri</i>
61	Y R E M L I A D G I D P N E L L N S M A A A K S G T K A K R	H-NS <i>Salmonella typhimurium</i>
61	Y R E M L I A D G I D P N E L L Q T M A A N K A A G K A K R	H-NS <i>Serratia marcescens</i>
61	Y R E M L I A D G I D P N E L L Q S L G S S K V A G K A K R	H-NS <i>Erwinia chrysanthemi</i>
61	Y R E L L I A D G I D P T D L L E A A G A S K T G R A K R A	H-NS <i>Proteus vulgaris</i>
61	W L E L M K A D G I N P E E L L G N S S A A A P R A G K K R	StpA <i>Escherichia coli</i>
61	Y K E L M E K E G I T P E E L H E I F G T K T V S I R A K R	H-NS <i>Haemophilus influenza</i>
61	E A P V S L Q Q R I E T N G Q L A A A A K D A A A Q A K S T	H-NS <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
91	A Q R P A K Y S Y V D E N G E T K T W T G Q G R T P A V I K	H-NS <i>Escherichia coli</i>
91	A Q R P A K Y S Y V D E N G E T K T W T G Q G R T P A V I K	H-NS <i>Shigella flexeri</i>
91	A A R P A K Y S Y V D E N G E T K T W T G Q G R T P A V I K	H-NS <i>Salmonella typhimurium</i>
91	A R R P A K Y Q Y K D E N G E L K T W T G Q G R T P A V I K	H-NS <i>Serratia marcescens</i>
91	A A R P A K Y Q Y T D E N G E L K T W T G Q G R T P A V I K	H-NS <i>Erwinia chrysanthemi</i>
91	A R P A K Y S Y V D D N G E T K T W T G Q G R T L A V I K R	H-NS <i>Proteus vulgaris</i>
91	Q P R P A K Y K F T D V N G E T K T W T G Q G R T P K P I A	StpA <i>Escherichia coli</i>
91	A P R P A K Y A F I D E N G E H K T W T G Q G R T P R P I Q	H-NS <i>Haemophilus influenza</i>
91	V E G A N D A L A R N A S V P A P S H S P V P L I V A V T L	H-NS <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
121	K A M D E Q G K S L D D F L I K Q	H-NS <i>Escherichia coli</i>
121	K A M D E Q G K S L D D F L I K Q	H-NS <i>Shigella flexeri</i>
121	K A M E E Q G K Q L E D F L I K E	H-NS <i>Salmonella typhimurium</i>
121	K A I E E Q G K S L D D F L L	H-NS <i>Serratia marcescens</i>
121	K A I E E Q G K S L D D F L L	H-NS <i>Erwinia chrysanthemi</i>
121	A I E E E G K S L E D F L I	H-NS <i>Proteus vulgaris</i>
121	Q A L A E G K S L D D F L I	StpA <i>Escherichia coli</i>
121	N A L N K G K S L S D F E I	H-NS <i>Haemophilus influenza</i>
121	S L L A L L L I R Q L R R R	H-NS <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Abb. 34 : Phylogenetischer Vergleich der Aminosäuresequenz von H-NS-Proteinen verschiedener Mikroorganismen

(Fraser *et al.*, 1995; Himmelreich *et al.*, 1996) mit H-NS vergleichbare Proteine gefunden. Auch in der Gruppe der *Cyanobacteriaceae* mit dem vollständig sequenzierten Genom von *Synechocystis* sp. (Kaneko *et al.*, 1996) und *Spirochaetae* mit dem bekannten Genom von *Borellia burgdorferi* (Fraser *et al.*, 1997) konnte kein mit H-NS vergleichbares Protein identifiziert werden. Daß man in diesen Gruppen keine Homologien findet, sollte nicht weiter erstaunen, weil sie phylogenetisch weit von den Bacteroiden entfernt sind. Aber auch in sehr verschiedenen Sequenzen bei

Helicobacter pylori (Tomb *et al.*, 1997) innerhalb der Proteobakterien konnte kein *hns* nachgewiesen werden, so daß sich zumindest keine absolute Regel ableiten läßt. Festhalten kann man, daß innerhalb der *Enterobacteriaceae* und der *Pasteurellaceae* eine starke Homologie auf Aminosäureebene ist, die auch in funktionellem Bereich zutrifft. Weiter fand man in verschiedenen gram-negativen Bakterien Proteine, die eine Homologie zu H-NS auf Aminosäureebene besitzen und nicht in allen Fällen funktionelle Gemeinsamkeiten besitzen, dazu gehören die Proteine MdbA (O'Brien & Mahamty, 1994) und Orf4 (Tietze & Tschape, 1994; Nieto & Juarez, 1999) aus *E. coli*, Spb aus *Rhodobacter sphaeroides* (Shimada *et al.*, 1996), HvrA aus *Rhodobacter capsulatus* (Buggy *et al.*, 1994), XrvA aus *Xanthomonas oryzae* (Dow, unpubliziert) und BpH3 aus *Bordella pertussis* (Goyard & Bertin, 1997) und das Protein VicH aus *Vibrio cholerae* (Bertin *et al.*, 1999; Tendeng *et al.*, 2000).

StpA, das H-NS Paralog, das zu H-NS eine Identität von 58 % besitzt, wurde außer in *E. coli* auch in *Salmonella typhimurium* gefunden. Für BpH3 ist die Funktion im Stoffwechsel noch nicht bekannt, von XrvA weiß man nur, daß diesem Protein eine Rolle bei dem Befall seiner Wirtspflanze Reis zukommt. Die beiden Proteine aus dem Genus *Rhodobacter* haben Regulationsfunktion. Sie kontrollieren in beiden Mikroorganismen die Licht abhängige Expression des *puf* Operons, der das Apoprotein des Lichtsammelkomplexes I und das Reaktionszentrum kodiert. Spb wirkt als Repressor des Operons, HvrA wirkt in *R. capsulatus* als *trans*-Aktivator.

Diese Proteine sind nicht nur strukturell miteinander verwandt, sondern haben trotz erheblicher Abweichungen in der Aminosäuresequenz auch funktionelle Gemeinsamkeiten. Das wird dadurch belegt, daß ein Teil der *hns* Phänotypen wie Verwertung von β -Glucosiden, die mucoide Kapsel, den Wachstumsertrag und auch die Empfindlichkeit gegenüber Serin durch diese Proteine komplementiert werden können (Bertin *et al.*, 1999).

Aus diesen Erkenntnissen läßt sich ableiten, daß diese Proteine möglicherweise auf ein Protein zurückgehen, das in seiner Funktion ein weites Spektrum abdeckt und erst später nach der Verbreitung durch Duplikation innerhalb der gleichen oder durch homologen Gentransfer in andere Bakteriengruppen ein zunehmende Spezialisierung einsetzt. Für die zunehmende Spezialisierung innerhalb einer Familie könnten StpA und mit Abstrichen auch MdbA angeführt werden, die im Vergleich zu H-NS sich weiter spezialisiert haben. Aber auch die in anderen Familien ausgeprägten Proteine HvrA, Spb und BpH3 leiten sich von diesem Vorläufer ab und sind funktionell auf begrenztere Bereiche des Stoffwechsels beschränkt.

V. Diskussion

Dem Protein H-NS (histone-like nucleoid structuring protein) kommt in der Zelle eine Vielzahl von Aufgaben zu, die sich in zwei einander jedoch stark tangierende Bereiche gliedern lassen. Zusammen mit anderen Nukleoid-assoziierten Proteinen wie Fis, Lrp, IHF, HU und Dps, ist H-NS an der Gliederung des Genoms in höhere Ordnungseinheiten und dem Erhalt der Genomintegrität beteiligt. H-NS greift als ein eng mit dem Nukleoid assoziiertes Protein (Spassky *et al.*, 1984; Talukder *et al.*, 1999) in Prozesse wie Replikation, Rekombination, Transposition und Transkription. Neben der Organisation der chromosomalen DNA, ist H-NS ein Transkriptionsregulator für eine Reihe Umwelt kontrollierter Gene. H-NS kommt dabei eher die Rolle eines hierarchisch übergeordneten globalen Modulators, als eines klassischen Transkriptionsregulators zu. Zum Teil erfolgt die Regulation zusammen mit anderen Nukleoid-assoziierten Proteinen oder spezifischen Transkriptionsfaktoren. Für beide Funktionen ist die Fähigkeit, selektiv aber nicht sequenzspezifisch an DNA zu binden, entscheidend. Für die Arbeit war es von Interesse, wie das 137 Aminosäuren große Protein diese Doppelfunktion erfüllen kann.

1. Regulation verschiedener zellphysiologischer Vorgänge durch H-NS

Von den in unsere Arbeitsgruppe aus verschiedenen Mutantenscreens erhaltenen Punktmutanten und IS-Insertionen in *hns* (Perraud, 1994) wurden nur die Mutationen ausgewählt, die im *hns*-Strukturgen lokalisiert sind und für die Untersuchungen zur Korrelation von Struktur und Funktion sinnvoll erschienen. Bei der Untersuchung verschiedener *hns*-Allele stellt sich heraus, daß die Punktmutanten nicht wie die Allele *hns206* und *hns205* zum Ausfall aller bzw. der meisten Funktionen führen, die H-NS in der Zelle hat. Von allen Punktmutanten wird ein komplettes Genprodukt geliefert, das zum größten Teil auch noch funktionsfähig ist. Sie zeigen meist nur geringfügige Modifikationen in der Stärke der Expression der den untersuchten Genprodukten. Das ist auch der Grund, weshalb die zwei-dimensionale Gelelektrophorese beim Vergleich von Wildtyp- und Punktmutanten-Muster so wenige Unterschiede ergab. Zwar wurden in der Vergangenheit außer für H-NS die Proteinmuster von mehreren Regulatorproteine, wie das universelle Streßprotein UspA (Nystrom & Neidhardt, 1992), RpoH (Jenkins *et al.*, 1991), RpoS (Barth *et al.*, 1995), Lrp (Laurent-Winter *et al.*, 1997) und IHF (Bykowski & Sirko, 1998) untersucht, der Vergleich von Wildtypmuster und Muster der jeweiligen Deletionsmutante erbringt jedoch drastischere Effekte.

Wie exemplarisch an *proU* und *bgl* gezeigt, weisen die ausgewählten Punktmutanten unterschiedliche Regulationsfähigkeit auf. Bezüglich der Derepression des *proU* Operons, haben alle untersuchten Mutanten die Fähigkeit verloren, *proU* zu reprimieren, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Dies ist erwartet, da diese Mutanten in einem Screen identifiziert wurden, der auf der Derepression der *proU-lacZ* Fusion bei niedriger Osmolarität beruht. Die Fähigkeit, *proU* in

Abhängigkeit zur Osmolarität zu exprimieren (Gowrishankar, 1989; Barron *et al.*, 1986; Csonka & Hanson), ist noch vorhanden, da in den mit Salz gezogenen Kulturen generell eine Induktion der *proU-lacZ* Fusion erfolgt. Von Relevanz scheint die Art des Aminosäureaustausches zu sein, weil der Austausch durch unterschiedliche Aminosäuren an einer Position zu verschieden hoher Expression führt (Ueguchi *et al.*, 1996). Alle hier näher untersuchten Punktmutanten können die *proU* Expression nicht ausreichend reprimieren, aber die *bgl* Expression kann ein Teil der untersuchten Mutanten reprimieren.. Alle Aminosäureaustausche in der vorderen Hälfte des H-NS-Proteins, an Position 14, 30 und 47 haben die Fähigkeit das *bgl*-Operon zu reprimieren, verloren, wohingegen Allele mit Aminosäureaustausche in der hinteren Proteinhälfte an Position 110, 111 und 113 dazu in der Lage sind. Die von uns gefundene Verteilung des Bgl-Phänotyps entspricht den von Ueguchi *et al.*, (1996) gefundenen Ergebnissen, die für verschiedene C-terminalen Aminosäureaustausche einheitlich einen Bgl⁻-Phänotyp fanden. Die Ausprägung der einzelnen Allele ist eindeutig allelspezifisch und mit bestimmten Arrealen in dem Protein verknüpft.

Das einzige Experiment, bei dem keine Allelspezifität festgestellt wurde, ist die Untersuchung der Excisionsrate für das Herausschneiden des *Tn10* aus dem *malF* Gen, die bei keiner der Punktmutanten erhöht ist. Auch wurden nur die Austausche in dem C-terminalen Loop untersucht, die zwar die DNA-Bindung vermitteln, aber weiterhin ausreichen, daß die mutierten H-NS-Proteine das Ausschneiden des transposablen Elementes *Tn10* aus dem Chromosom reprimieren können. Die Beeinflussung des Excisionsvorgangs benötigt wahrscheinlich die Deletion größerer Bereiche des Proteins.

Für *hns205* und *hns206* gilt, daß die spontane Deletionsfrequenz in *hns*-Mutanten drastisch erhöht ist (Lejeune & Danchin, 1990), dadurch entstehende physiologische Defizite, wie verlangsamtes Wachstum wird in *hns205* und *hns206* durch spontane Supressormutationen kompensiert. Für die untersuchten *hns*-Punktmutanten konnte eine erhöhte spontane Deletionsfrequenz nicht festgestellt werden.

Wenn auch der Schwerpunkt der Arbeit darauf lag, die Effekte verschiedener Punktmutationen auf die physiologische Funktion zu untersuchen, wurde auch das Umwelt kontrollierte Gen *frdA*, das erste Gen des Operon für die Fumaratreduktase getestet, das in Abhängigkeit von Sauerstoff und durch das Angebot verschiedener C-Quellen reguliert wird. Drei spezifische Regulatoren beeinflussen auf Transkriptionsebene: FNR vermittelt die Induktion unter Abwesenheit von Sauerstoff, NarL die Repression durch Nitrat unter anaeroben Bedingungen und das Zweikomponentensystem DcuSR die Induktion durch Dicarboxylate. Weil das Expressionsverhalten der Fumaratreduktase durch das Protein FNR nicht hinreichend erklärt werden konnte (Iones & Gunzalus, 1987; Ziegler, 1996; Zientz *et al.*, 1998), wurde auch der globale Modulator von Genexpression, H-NS, überprüft. Wie sich herausstellte, hat wohl auch H-NS auf die Expression dieses Enzymkomplexes einen Einfluß, jedoch nur modulierend.

2. Struktur von H-NS

H-NS ist im Vergleich mit anderen Nukleoid-assoziierten Proteinen ein neutrales Protein mit sauren und basischen Aminosäureclustern. Aus der Aminosäuresequenz gehen keine auffällig strukturellen Gemeinsamkeiten mit anderen DNA-Bindeproteinen hervor, die meist Helix-Turn-Helix-, Zinkfinger- oder ein Leucinzipper-Motive (Harrison *et al.*, 1991) aufweisen. Auch in NMR-Untersuchungen mit dem proteolytisch auf die Aminosäuren 91-137 verkürzten H-NS-Protein fand man keinerlei Hinweise hierzu (Shindo *et al.*, 1995).

Die N-terminale Domäne wurde aufgrund der Primärsequenz als reich an α -Helices vorhergesagt, aufgrund des hohen Anteils an Helix bildenden Aminosäuren wie Alanin, Glutaminsäure und Leucin. Die N-terminale Hälfte bis zur Aminosäure 64 ist höchst wahrscheinlich in Form einer „coiled coil“-Struktur angeordnet, bei der die α -Helices von drei Monomeren zu einer links gedrehten Superhelix umeinander gewunden sind (Smyth *et al.*, 2000). Solche Strukturen finden sich meist in Struktur- und Mobilitätsproteinen wie Spektrin, Dystrophin und Myosin (Ussery *et al.*, 1994) und sind für DNA-Bindeproteine eher ungewöhnlich. Die normale Geometrie der α -Helix ist dabei leicht verändert, um sich in die Superhelix einzupassen. Die Interaktion erfolgt über hydrophobe Reste, sie bilden entlang einer jeden Helix ein unpolares Band. Zusätzlich stabilisiert wird die Struktur durch elektrostatische Interaktionen zwischen den Seitenketten. Für eine „coiled coil“-Struktur sprechen auch die Heptad-Wiederholungen, die aus der Aminosäuresequenz ableitbar sind (Abb. 35).

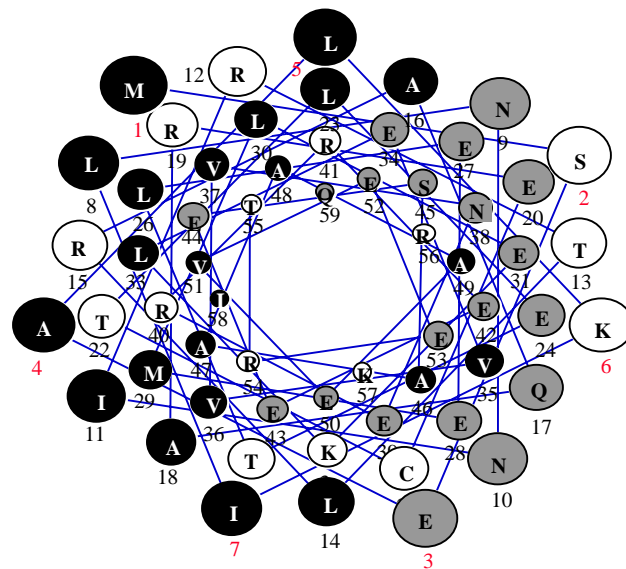


Abb. 35: Amphipathische Helix

Dargestellt sind die ersten 60 Aminosäuren der N-terminalen Domäne als α -helicales Rad, die sauren Aminosäuren sind grau, die hydrophoben Aminosäuren sind schwarz eingezeichnet. Exemplarisch ist eine Heptad-Wiederholung dargestellt, die betreffenden Aminosäuren sind rot nummeriert.

Trägt man diese Aminosäuren in Form der Helixstruktur auf (Abb. 35), die diese Aminosäuren einnehmen, wird klar, daß die Helix amphipathisch ist mit deutlich hydrophober und hydrophiler

Seite. Die hydrophobe Seite kann bei der Dimerisierung hydrophobe Interaktionen mit einem anderen Monomer ausbilden. Die strukturelle Voraussetzung für die Ausbildung von höheren Oligomeren aus bis zu 20 Monomeren scheinen die Aminosäuren 65-89 zu sein, die die Bildung von heterodispersen Oligomeren begünstigen (Smyth *et al.*, 2000). Der Zustand der Oligomerisierung ist von der H-NS-Konzentration abhängig. Die Assoziation ist in zwei Stufen vorstellbar, erst assoziieren drei Monomere zu einem Trimer, das die Bildung der „coiled coil“-Struktur begünstigt und den Kern für die Assoziation weiterer Monomere darstellt (Smyth *et al.*, 2000). Das auf 47 Aminosäuren des C-Terminus verkürzte Protein (Abb. 36), von dem allein es bisher gelang, verlässliche Strukturdaten zu bekommen, weist ein antiparalleles β -Faltblatt, eine α -Helix und eine 3_{10} -Helix auf. Diese mit drei Aminosäureresten pro Windung dichter gewundene α -Helix bildet das hydrophobe Zentrum, das die gesamte Struktur stabilisiert (Shindo *et al.*, 1995).

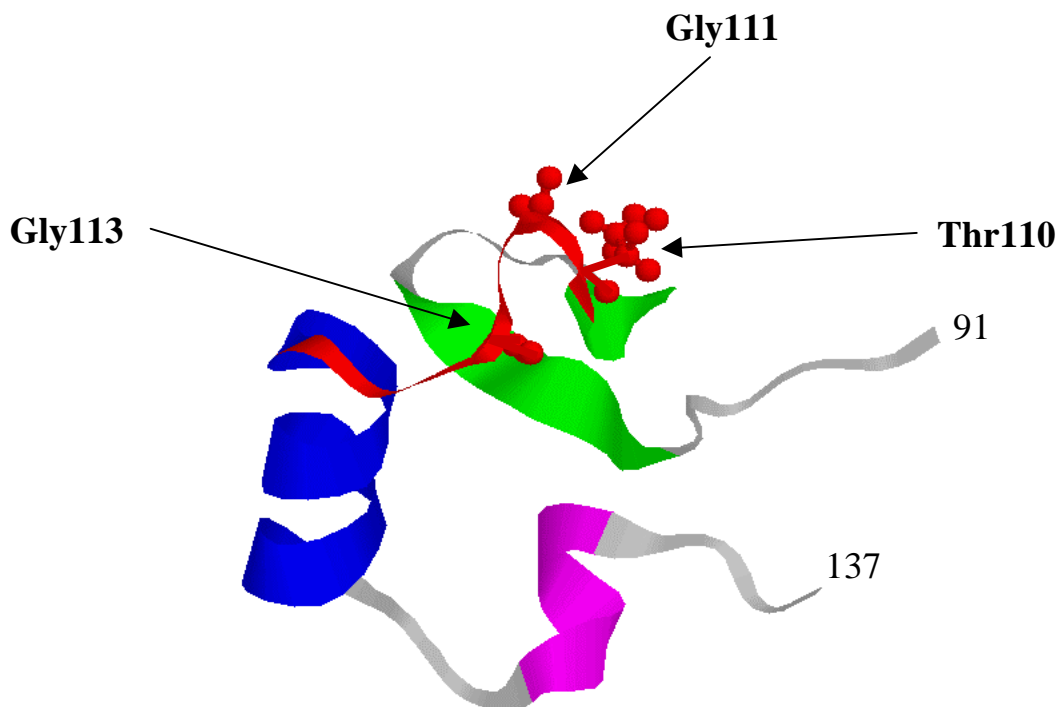


Abb. 36: C-terminale Domäne von H-NS (Aminosäure 91-137), abgeleitet aus NMR-Spektroskopie (Shindo *et al.*, 1995), modifiziert (Shindo *et al.*, 1999)

In Blau ist die α -Helix, in Grün die beiden antiparallelen β -Faltblätter, und in Magenta die 3_{10} -Helix dargestellt. Der rot unterlegte Loop ist maßgeblich an der DNA-Bindung beteiligt und die drei Aminosäurereste kennzeichnen die Reste, die in den Allelen *hns210*, *hns229* und *hns230* ausgetauscht sind.

Die Struktur wurde mit den aus der Protein Data Bank (PDB) des Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) extrahierten NMR-Daten von Shindo *et al.* (1995) mit dem Programm Rasmol erstellt.

Die gedrungene Form wird durch die Anzahl der Atome zwischen Donor und Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung bestimmt, die nur 10 Atome und nicht 16 wie in der α -Helix betragen, was bisher noch in keinem DNA-Bindeprotein gefunden wurde. Die gezeigte Struktur (Abb. 36) bezieht NOE-Daten (Shindo, persönliche Mitteilung) ein, die die 1995 abgeleitete Struktur

verfeinerten (Shindo *et al.*, 1999). Besonders auffällige Strukturmerkmale sind die beiden Loops, die beide mit der DNA-Bindung in Verbindung gebracht werden. Für Loop 2 (Abb. 36, rotes Band) ist das bereits bestätigt (Friedrich *et al.*, 1985; Tippner & Wagner, 1995). Drei der in dieser Arbeit untersuchten Mutanten sind in diesem Abschnitt lokalisiert (Abb. 36). Durch die Sekundärstruktur sind die beiden Loops einander angenähert, was eine konzertierte Zusammenarbeit bei der DNA-Bindung ermöglichen kann. Neuere biochemische und biophysikalische Daten gehen, davon aus, daß die C-terminale Domäne als Monomer vorliegt, frei beweglich ist und nicht zur Oligomerisierung beiträgt (Smyth *et al.*, 2000). Räumlich sind die zwei strukturellen Domänen durch einen Linker verbunden, der sich von Aminosäure 76 und Aminosäure 90 erstreckt.

3. Struktur-Funktionsbeziehung

Die meisten Ansätze bei der Aufklärung von Struktur und Funktionsbeziehung wählten den Weg über die Analyse von verkürzten Proteinfragmenten und Punktmutanten. Anhand von Funktionsausfällen wurde dann auf Zuständigkeiten bestimmter Proteinregionen geschlossen (Ueguchi *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1996; Spurio *et al.*, 1997; Ueguchi *et al.*, 1997). Durch die Korrelation der aus der Mutantenanalyse gewonnenen Erkenntnisse mit Strukturaufklärung bzw. -vorhersagen und dem Vergleich mit homologen Proteinen konnte ein plausibles Modell für H-NS gewonnen werden kann. Allerdings lassen sich nicht alle gewonnen Ergebnisse aus den verschiedenen untersuchten Expressionssystemen problemlos in ein einziges Modell einordnen.

Durch vorangegangene Arbeiten ist klar, daß es sich bei der C-terminalen Domäne um die DNA-Bindedomäne handelt und in der N-terminalen Domäne die Funktion der Di- bzw. Oligomerisierung lokalisiert ist. Für die DNA-Bindedomäne sprach, daß sich die Spektren der durch den Tryptophanrestes 109 verursachten Fluoreszenz durch DNA-Bindung in dieser Region änderte und daß verschiedene C-terminale Fragmente (Dersch, 1995) und Deletionsmutanten (Ueguchi *et al.*, 1997) nicht mehr in der Lage waren DNA zu binden.

Für die N-terminalen Domäne, wurde die physiologische Funktion Protein-Protein-Interaktionen eingehen zu können durch Crosslinking-Experimente (Williams *et al.*, 1996) und durch Gel-filtration (Ueguchi *et al.*, 1997) bestimmt. Ziel der Struktur-Funktionsanalysen ist es die Funktionen verschiedenen Domänen bis auf die Ebene einzelner Aminosäuren zu definieren.

3.1 Die verschiedenen *hns*-Punktmutanten

Betrachtet man die in unserem Labor isolierten (Abb. 3) und die von anderen Gruppen gefundenen Mutationen, ist offensichtlich, daß die Mutanten nicht zufällig verteilt sind. Dies ist zum einen der zentrale Abschnitt, die sogenannte Linkerregion zwischen den Aminosäuren 76 und 88, die auch bei Sequenzvergleichen mit den *hns*-Sequenzen anderer *Enterobacteriaceae* als hoch konserviert aufgefallen ist. Über die Funktion ist noch nichts genaues bekannt. Die gefundenen Mutationen treten in Clustern auf, so am Anfang der N-terminalen Domäne und in

der Mitte der C-terminalen Domäne im Bereich um die Aminosäuren 90-95 und Aminosäuren 110-115 oder etwas weiter ge-faßt in der Region von Aminosäuren 109-117.

Die Häufung der Austauschmutanten in dieser Region, in der auch die meisten von uns lokalisierten Mutanten anzutreffen sind, und die starke Konservierung dieser Region in H-NS-Proteinen anderer *Enterobacteriaceae* und in StpA läßt auf die physiologische Relevanz schließen. Änderungen in dieser Region müssen auf die Aktivität und Funktionalität des Proteins tiefgreifende Einflüsse haben. Die Codondeletion Δ Ala 47 ist außer in unserer Gruppe noch mehrfach isoliert worden (Hinton *et al.*, 1992). In dieser Region weist das Protein vier aufeinander folgende Alanine auf, so daß dort die Wahrscheinlichkeit, daß sich bei der Replikation die beiden DNA-Stränge verschieben und als Folge daraus ein Alanin weniger in das Protein eingebaut wird, erhöht ist. Die weiteren behandelten Punktmutanten sind alle durch Veränderung von nur einer Base an der zweiten oder dritten Stelle des betroffenen Codons entstanden.

Auch der Aminosäureaustausch des Allels *hns210* ist mehrfach gefunden worden (Perraud, 1994), z.T. jedoch wurde die Aminosäure Threonin durch andere Aminosäuren wie Isoleucin ersetzt (Ueguchi *et al.*, 1996).

Die mehrfach isolierten Aminosäureaustausche von Leucin zu Prolin an Position 14, 26 (Williams *et al.*, 1996) und 30 wirken als Helixbrecher, weil die Seitenkette von Prolin kovalent an den Stickstoff der Peptidbindung gebunden ist, was der Bewegung um die Achse der Peptidbindung entgegen wirkt. Auch können keine Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden, weil die -NH-Gruppe fehlt. Prolin weicht lokal generell die helicale Struktur auf, im Fall von H-NS stört Prolin an den erwähnten Positionen tiefgreifend die Proteinfaltung und die bevorzugte „coiled coil“ Struktur kann nicht mehr ausgebildet werden (Woolfson & Williams, 1990; Yaron & Naider, 1993). Prolin begünstigt die *cis*-Peptidbindungen, die Bindungen, an denen der geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Proteinfaltung stattfindet (Creighton, 1993). Die veränderte Faltung von H-NS224 wird auch durch das vom Wildtypprotein abweichende Laufverhalten im SDS-Gel offensichtlich. Deutlich wird die Bedeutung des Aminosäureaustausches für die Proteinfaltung in den Experimenten mit verschiedenen Aminosäureaustauschen an Position 30. Der Austausch von Leucin durch Prolin oder Asparaginsäure führt zum Funktionsverlust, der Austausch durch Alanin oder Lysin zu keinem Effekt oder nur zu einer geringen Funktionseinschränkung (Ueguchi *et al.*, 1997).

3.2 DNA-Bindfähigkeit von H-NS

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Funktion eines DNA-Bindeproteins ist die Interaktion mit seinem Substrat. H-NS hat in Abstufung Bindungsaffinität zu allen Nukleinsäuren, wobei gebogene, doppelsträngige DNA mit der größten Präferenz gebunden wird.

Durch eine Reihe von „footprinting“ Experimenten (Lucht *et al.*, 1994) an verschiedenen Promotoren konnte nachgewiesen werden, daß H-NS AT-reiche und gebogene Sequenzen bevorzugt, sich aber in erster Linie nach der räumlichen Architektur richtet (Spurio *et al.*, 1997).

Die DNA-Bindefähigkeit der H-NS-Proteine verschiedener Punktmutanten wurde in dieser Arbeit hinsichtlich zweier Aspekte betrachtet. Die spezifische DNA-Bindung wurde in Gelretardierungsassays untersucht und in den Fällen, in denen das nicht möglich war, indirekt durch die Repression der *proU-lacZ* Fusion mit den *in vivo* Experimente mit den pBAD-Derivaten. Außerdem wurde durch Bestimmung der H-NS-Menge in der von Wildtyp und Mutanten indirekt ermittelt, ob mutiertes H-NS noch in der Lage ist, die Expression von *hns* zu regulieren. Auf die eher unspezifische DNA-Interaktion wurden Rückschlüsse mittels der Darstellung der Nukleoidkondensation gezogen, bei der schon wegen des großen H-NS-Überschusses durch die Überproduktion von unspezifischer Bindung ausgegangen werden muß.

Für alle untersuchten Punktmutanten ist eine verminderte Bindefähigkeit an die native DNA-Cellulose festzustellen, sowohl für die *hns*-Allele im N-terminalen Ende *hns224* und *hns233* als auch für die im C-terminalen Ende *hns208*, *hns210*, *hns229* und *hns230*. Für *hns224* wurde dies zusätzlich direkt in Bandshifts gezeigt. Für die anderen Allele wurde dies indirekt in den Experimenten mit den pBAD-Derivaten durch den Verlust der Fähigkeit, die *proU-lacZ* Fusion zu reprimieren, demonstriert. Herauszuheben ist dabei, daß die DNA-Bindung auch bei den Mutanten herabgesetzt ist, deren Aminosäureaustausch nicht in der DNA-Bindedomäne lokalisiert ist. Ergänzend konnte Ueguchi *et al.* (1996) mit gereinigtem H-NS, das eine Punktmutationen an Position 12 bzw. eine in der DNA-Binderegion am C-terminalen Ende trägt, herausfinden, daß die DNA-Bindefähigkeit der C-terminalen Mutante stärker beeinträchtigt ist, als diejenige der im ersten Drittel von H-NS lokalisierten Mutante. Die DNA-Bindung von H-NS mit dem Aminosäureaustausch an Position 12 ist fast mit dem Wildtyp vergleichbar. Der Vergleich der Bandshifts (Ueguchi *et al.* 1996) mit denen von mir durchgeführten ist nur bedingt zulässig. Zwar wird der gleiche Promotor benutzt, jedoch in andere Fragmente geschnitten und eine nur halb so große Menge an DNA verwendet. Auch ist eine Beeinträchtigung der Bindung offensichtlich nur in den Fällen festzustellen, bei denen es um Transkriptionsrepression, also um spezifische DNA-Bindung geht.

Auch im Fall der Nukleoidkondensation weisen die *hns224*- und die *hns233*-Mutante ein eher dem Wildtyp vergleichbares DNA-Bindevverhalten auf. Mutationen im ersten Drittel des Proteins beeinträchtigen die Ausbildung der Protein-Protein-Kontakte (Williams *et al.*, 1996; Ueguchi *et al.*, 1997) und somit die Dimerisierung, die eine Voraussetzung für die DNA-Bindung darstellt. Die durch Überproduktion erhöhte H-NS-Menge kann hier die geringere DNA-Bindefähigkeit etwas kompensieren. Nur bei den Punktmutanten im C-Terminus ist eine deutlich verminderte Nukleoidkondensation festzustellen, das Bindungsdefizit kann durch die Proteinmenge nicht kompensiert werden. Dies wird auch durch Experimente von Spurio *et al.* (1992) gestützt, die in vergleichbaren Experimenten mit einer im C-Terminus um ein Tetrapeptid verkürzten Mutante eine verminderte generelle DNA-Bindefähigkeit und eine schwächere Nukleoidkondensierung bei H-NS-Überproduktion fanden. Auch die C-terminal verkürzten Fragmente zeigen eine Beeinflussung der Kondensation des Nukleoids, wobei die langen Fragmente oberhalb einer Größe von 117 Aminosäuren kaum einen vom Wildtyp zu unterscheidenden Effekt haben. Das 75 Aminosäuren lange Fragment kondensiert das Nukleoid schwächer als das Wildtyp-H-NS. Das

stimmt auch mit den von P. Dersch (1995) gefundenen verminderten DNA-Bindefähigkeit überein besonders hinsichtlich des kürzesten Fragmentes.

Es läßt sich also folgern, daß der C-Terminus allein für die unspezifische DNA-Bindung ausreicht, aber für die spezifische Bindung auch Bereiche des N-Terminus notwendig sind.

Das Phänomen der Nukleoidkondensation, das auch in abgeschwächter Form bei dem H-NS-Paralog StpA gefunden wurde (S. Finken-Henn, persönliche Mitteilung), ist typisch für Nukleoid-assoziierte Proteine. Eine auffällige Nukleoidkondensation wurde auch bei anderen Histon ähnlichen Proteinen Hc1 des parasitär lebenden Bakterium *Chlamydia trachomatis*, das heterolog in *E. coli* überproduziert wurde (Barry *et al.*, 1992; Pedersen *et al.*, 1994), gefunden.

3.3 Oligomerisierung

Die Fähigkeit von H-NS zu di- und oligomerisieren ist mehrfach nachgewiesen worden (Falconi *et al.*, 1988; Ueguchi *et al.*, 1996). Bis 1997 gab es jedoch keine Deletions- oder Punktmutationen, mit deren Hilfe man die an der Di- und Oligomerisierung beteiligten Aminosäuren enger eingrenzen und die Funktion der Dimerisierung eindeutig einem Strukturabschnitt zuordnen konnte (Ueguchi *et al.*, 1997). Mit verschiedenen verkürzten H-NS-Derivaten wurde untersucht, bis zu welcher Länge der N-terminalen Domäne über Crosslinking Mischformen mit dem Wildtyp nachgewiesen werden konnte (Williams *et al.*, 1996). Mit verschiedenen N-terminalen Fragmenten und einem H-NS-Protein, dem die Aminosäuren an Position 2-20 entfernt wurden, wurde der Abschnitt der Protein-Protein-Interaktion auf die Region zwischen Aminosäure 21 und 63 eingegrenzt (Ueguchi *et al.*, 1997).

Die spezifische DNA-Bindefähigkeit läßt sich nicht allein durch Punktmutationen und Deletionen im C-terminalen Ende erklären, weil auch bei Mutanten mit Aminosäureaustausch im N-terminalen Abschnitt die DNA-Bindefähigkeit beeinträchtigt ist. So bindet die Mutante mit dem Aminosäureaustausch R12C (Ueguchi *et al.*, 1997) ähnlich spezifisch wie der Wildtyp an die *proU*-Promotorregion. Das Protein H-NS224 mit Austausch L30P hat darin deutliche Defizite. Beide jedoch sind in der N-terminalen Domäne lokalisiert.

Wie in den Komplementationsversuchen mit den pBAD-Derivaten deutlich geworden ist, können sowohl Punktmutationen, die in der N-terminalen Hälfte als auch in der C-terminalen DNA-Binderegion lokalisiert sind, *proU* nicht reprimieren. Zuvor wurde in einem *in vitro* Assay (Ueguchi & Mizuno, 1993) gezeigt, daß entsprechend H-NS^{R12C} und H-NS^{G113D} *proU* nicht reprimieren können (Ueguchi *et al.*, 1996), was darauf hinweist, daß für die korrekte Funktion des Proteins beide Domänen notwendig sind.

Weiter weist auch die in der DNA-Binderegion lokalisierte Mutante P116A auf eine engere Verflechtung der beiden Domänen und ihre Funktionen hin (Spurio *et al.*, 1997). Dieser Aminosäureaustausch führt dazu, daß das Protein defekt in der Oligomerisierung ist, bei Gelfiltration eluierte das Protein anders als der Wildtyp und ließ auf einen anderen Aggregationszustand schließen. Zu dem gleichen Phänotyp führt eine Mutation, die zum Austausch von Trp-109 führt (Spurio *et al.*, 1997). Diese Befunde müssen jedoch noch auf eine breitere Datenbasis gestellt werden.

Auch auf Aminosäureebene läßt sich die Kopplung von Oligomerisierung und DNA-Bindung ableiten, wie in früheren Arbeiten mit C-terminalen Fragmente gezeigt worden war (Dersch, 1995).

3.4 Negative Dominanz der Punktmutanten und der C-terminal verkürzten H-NS-Fragmente

Unter negativer Dominanz versteht man, wenn sich ein mutiertes Allel gegenüber dem Wildtyp-allel durchsetzt und damit der Verlust des Wildtyp-Phänotyps verbunden ist. Bei Eukaryonten ist das aufgrund des doppelten Chromosomensatzes leicht vorstellbar, bei Bakterien setzt sich meist ein Plasmid kodiertes, mutiertes Allel gegenüber dem chromosomal kodierten Wildtyp-Allel durch. Das Plasmid kodierte Allel setzt sich auch aufgrund der höheren Dosis gegenüber dem einfach chromosomal kodierten Allel durch. Auch scheint es bei der in der Arbeit untersuchten Allelen davon abzuhängen, wo die Mutation und der daraus resultierende Aminosäureaustausch lokalisiert ist. Bei allen in dieser Arbeit näher untersuchten Allelen, die zum Aminosäureaustausch an Position 14, 30 und 46 und den im letzten Drittel lokalisierten Aminosäuren 110, 111 und 113 führten, konnte ein dominant negativer Phänotyp festgestellt werden. Gezeigt hat er sich dadurch, daß sich das chromosomale Wildtypallel in Anwesenheit von einer *hns* Mutation als pBAD-Derivat bzw. im Fall von *hns224* (I30L) als pPD100-Derivat nicht verwirklichen konnte und es zur Derepression des *proU* Operons kam.

Negative Dominanz findet sich bei Bakterien und Eukaryonten häufig bei Genen, die Proteine kodieren, für deren Funktion DNA- bzw. RNA-Bindung oder Protein-Protein-Interaktion von zentraler Bedeutung sind. So finden sich darunter häufig Proteine aus Signaltransduktionskaskaden, wobei die sensorische Membrankomponente wie der Östrogenrezeptor (Ince *et al.*, 1993; McInerney *et al.*, 1996), der Thyroidhormonrezeptor (Zavacki *et al.*, 1993), der Insulinrezeptor (Prager *et al.*, 1994), Proteinkinasen (Fleig *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 1998), G-Proteine (Sung *et al.*, 1996) als auch die regulatorische DNA-Bindeproteine (Brachmann *et al.*, 1996; Srivastava *et al.*, 1993) und RNA-Bindeproteine davon betroffen sein können. Auffallend häufig finden sich bei Eukaryonten dominant negative Mutationen bei Proteinen, die in zentralen Regelkreisen verwickelt sind, die, wenn sie entarten, meist Tumorbildung zur Folge haben. Exemplarisch seien hier die Onkogene *jun* und *fos* (Ransone *et al.*, 1990), die beide Transkriptionsfaktoren kodieren, verschiedene Ras-Proteine (Kaplan, 1994; Shichinohe *et al.*, 1996; Sung *et al.*, 1996) und das Tumorsuppressorprotein p53 (Srivastava *et al.*, 1993) genannt.

Auch bei Bakterien scheint das Phänomen auffällig viele regulatorische spezifische DNA-Bindeproteinen wie FNR (Lazazzera *et al.*, 1993), LexA, und UmnD (Battista *et al.*, 1990) zu betreffen. Aber auch unspezifischere DNA-Bindeproteine aus DNA-Reparatursystemen sind vertreten wie RecA (Cazaux *et al.*, 1994), die DNA Helikase II UvrB (George *et al.*, 1994), MutS (Wu & Marianus, 1994) und MutL (Aronshtam & Marianus, 1996). Seltener als bei Eukaryonten sind bei Bakterien Komponenten von Signaltransduktionskaskaden von solchen Mutationen beeinflusst wie das mutmaßliche G-Protein Era (Shimamoto & Inouye, 1996). Dabei sind die Proteine nur noch partiell funktionsfähig, sie haben die Fähigkeit DNA oder wie im Fall von MutS, UvrB und

DnaK (Wild *et al.*, 1992) die Fähigkeit ATP zu binden, verloren. Wechselwirkungen mit anderen Monomeren und die Bildung von Heteromultimeren ist generell noch möglich, jedoch wird dadurch nicht vollständige Funktionsfähigkeit erreicht. Es läßt sich folgern, daß negative Dominanz vor allem bei Aminosäureaustauschen auftritt, die essentiell für die Funktion sind und entweder mit DNA-oder Protein-Interaktion zu tun haben. Für H-NS gilt das offensichtlich auch, weil sowohl Mutationen in der N-terminalen Domäne, über die Protein-Protein-Interaktionen erfolgen, als auch in der für die DNA-Bindung verantwortlichen C-terminalen Domäne auftreten, wie das auch von Williams *et al.* (1996) gezeigt werden konnte.

Wenn man das bisher beschriebene in einem Modell zusammenfaßt, ergibt sich exemplarisch für die Transkriptionsrepression des *proU* Operons folgendes Bild. Von dem Chromosom und dem Plasmid wird jeweils H-NS synthetisiert. Wenn man davon ausgeht, daß das mutierte Protein-derivat auf dem Plasmid kodiert ist, wird es in größerer Menge produziert. Wenn die Fähigkeit der DNA-Bindung verloren gegangen ist, ist das Protein nicht mehr ausreichend in der Lage, das *proU* Operons zu reprimieren. Es können sich zwar Dimere, Trimere und höhere oligomere Strukturen bilden, die auch Wildtypmonomere binden und somit das funktionsfähige Protein an der Repression hindern, mit der Folge, daß das *proU* Operon exprimiert wird. Entsprechendes gilt für Mutanten mit eingeschränkter Dimerisierungsfähigkeit. Die Monomere können generell noch an DNA binden, können aber ihre Funktion nur als Oligomer entfalten und das *proU* Operon wirkungsvoll reprimieren. Der Phänotyp der Derepression der im Experiment mit den pBAD-Derivaten meßbar war, gleicht sich dadurch, auch wenn die physiologische Ursache unterschiedlich ist.

In vorausgegangenen Untersuchungen (Dersch, 1995) wurde die negative Dominanz auch bei C-terminal verkürzten Fragmenten festgestellt, wobei es graduelle Unterschiede gab und diejenigen Fragmente mit einer Länge über 117 Aminosäuren den stärksten dominant-negativen ProU-Phänotyp aufwiesen. In diesen Fragmenten ist die DNA-Bindefähigkeit nahezu vollständig erhalten, jedoch die Bindungspräferenz zur *proU* Promotorregion nicht mehr so deutlich ausgeprägt. Auf 94 Aminosäuren verkürzte Fragmente zeigen eine generell reduzierte DNA-Bindung (Dersch, 1995; Ueguchi *et al.*, 1996). In Zusammenhang mit den C-terminal verkürzten Fragmenten konnte außerdem eine erhöhte Tendenz zur Oligomerisierung festgestellt werden, die allerdings Schwierigkeiten haben, an DNA zu binden.

Die für manche mutierte H-NS-Derivate typische Multimerisierung wird weitaus seltener auch bei anderen mutierten Proteinen beobachtet. Hydrophobe Domänen gelangen an die Proteinoberfläche und stehen für Wechselwirkungen zur Verfügung (Dill, 1990; Eriksson & Matthews, 1992).

Dominant negative Mutationen in H-NS und StpA führten zu Proteinen, die mit dem Wildtyp der anderen Proteinspezies interagieren konnten und in ihrer Funktion austauschbar waren. Die Mischform, die mit cross-linking nachweisbar war, war nur unzureichend in der Lage, am *proU* Promotor zu binden, auch die Bindung an den *hns* bzw. *stpA* Promotor war eingeschränkt (Williams *et al.*, 1996).

Auch scheint es bei den Proteinen kein Erkennungsmodus zu geben, wodurch die beiden Proteine sich erkennen, weil sie mit verkürzten und verschiedenen mutierten Formen Heterodimere bilden können.

Durch die eingeschränkte Bindung an den *hns* bzw. *stpA* Promotor ist die Mischform nicht in der Lage, die entsprechende Promotorregion ruhig zu stellen, somit entfällt die Autoregulation, was eine weitere Begründung dafür ist, daß die Beeinflussung durch dominant-negative Effekte auf Proteinebene stattfindet.

3.5 Verschiedene Modelle zur Aufteilung von H-NS in funktionelle Domänen

Für verschiedene untersuchte Expressionssysteme ergeben sich unterschiedliche Aufteilung des Proteins in Zuständigkeiten. Prominenteste Beispiele sind dabei die Expression von *proU*, *bgl* und *fimB*.

So existieren für das Protein H-NS verschiedene Modelle, die unterschiedliche Einteilungen in funktionelle Domänen vornehmen. Von der japanischen Arbeitsgruppe um T. Mizuno wurde H-NS aufgrund der Analyse von verschiedenen Mutanten bezüglich der Expression von *proU* und *bgl* in drei funktionelle Domänen aufgeteilt: eine Domäne für die Transkriptionsregulation am äußersten N-Terminus, daran anschließend einen Abschnitt für die Dimerisierung und die DNA-Bindedomäne am C-Terminus (Dersch, 1995; Ueguchi *et al.*, 1996; Ueguchi *et al.*, 1997). Dieser Vorstellung ist die etwas einfachere Einteilung der französischen Arbeitsgruppe um S. Rimsky und verschiedenen britischen Autoren gegenüber gestellt, die das H-NS-Protein nur in zwei Domänen aufteilen. Danach ist H-NS aus der N-terminalen Domäne, die die Protein-Protein-Interaktion vermittelt, und der C-terminalen Domäne, die für die DNA-Bindung verantwortlich ist, aufgebaut (Williams & Rimsky, 1997; Dorman *et al.*, 1999). Sie betont stärker die Gliederung des H-NS-Proteins durch die charakteristische Verteilung der Sekundärstrukturen in den durch Helices gekennzeichnete C-terminale Hälfte eine durch β -Faltblätter und Loops charakterisierte N-terminale Hälfte (Shindo *et al.*, 1999) (Abb. 37).

Die Unterteilung des Proteins wird von Sequenzvergleichen verschiedener anderer H-NS- und von dem Vergleich der Sequenzen H-NS ähnlicher Proteine wie StpA, MbdA, Spb (Dorman *et al.*, 1999) gestützt. Die zweigeteilte Funktion des Proteins durch die beiden Domänen ist durch eine Reihe von Proteinen belegbar, die nur einer der beiden Domänen ähneln, und in ihrer Funktion nur der Einzeldomäne ähneln und nicht der Funktion des Gesamtproteins, wie der Repressor KorB aus *E. coli*, der nur aus dem duplizierten C-terminalen Teil von H-NS besteht (Cusick & Belfort, 1998).

Die beiden Modellen unterscheiden sich in der räumlichen Abgrenzung der Funktionen, deutlicher unterscheidet sich davon das Modell der Arbeitsgruppe um T. Kawula, der anhand der Expression der Gene der Fimbrien H-NS analysiert hat und eine deutlich andere Aufteilung propagiert (Donato & Kawula, 1999). Die Gliederung von H-NS in zwei oder drei funktionelle Abschnitte kann die Ergebnisse von Experimente mit *fimB* nicht abbilden.

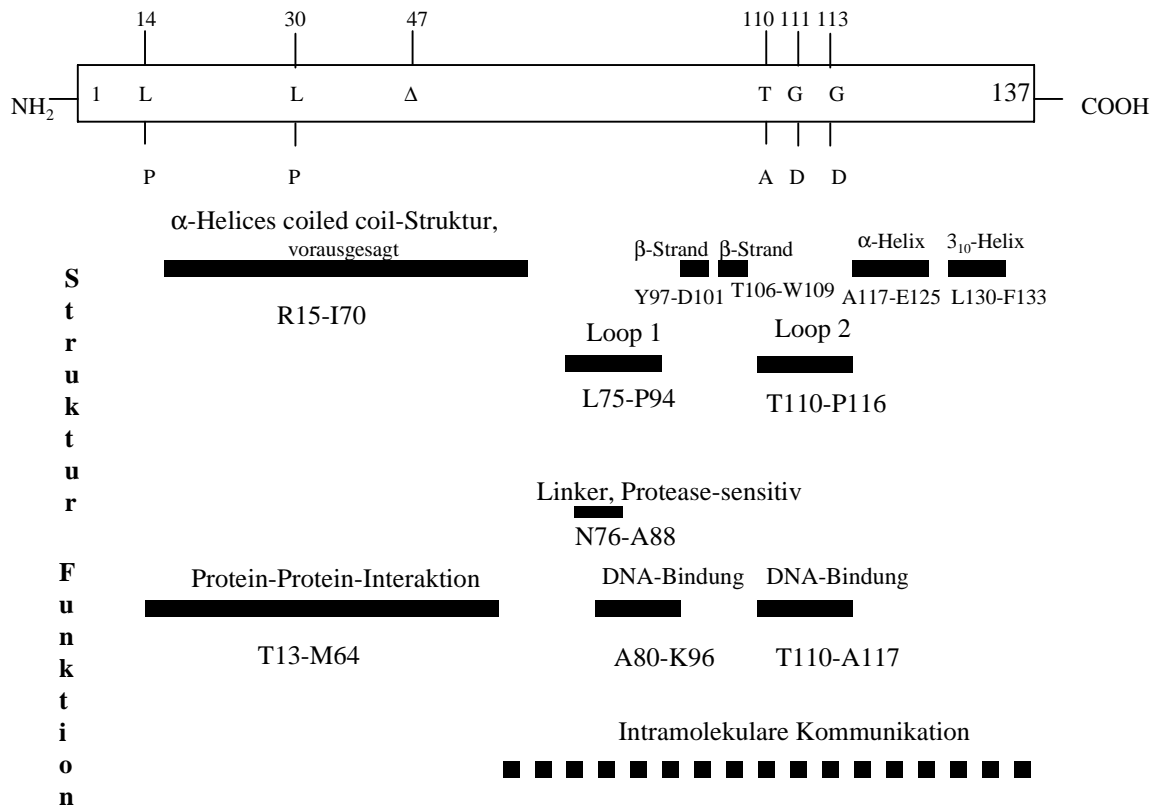


Abb. 37: Übersicht über die bisher bekannten funktionelle Domänen von H-NS und die ihnen zugeordnete Funktion

Eingezeichnet sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Mutanten aus unserer Arbeitsgruppe. Die Daten zur Struktur stammen von Shindo *et al.*, 1999, für die Struktur-Funktionsbeziehung wurden Ergebnisse von Ueguchi *et al.*, 1996; Ueguchi *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1996 und Dorman & Kawula, 1999 einbezogen.

Die Oligomerisierung und die DNA-Bindung sind zumindest bei der Genregulation und der Bindung im regulatorischen Bereich miteinander gekoppelt. Die Kopplung dieser zwei Funktionen ist ein bei DNA-Bindeproteinen häufiges Motiv der Regulation und bisher außer bei den Nukleoid-assoziierten Proteinen HU, Fis und IHF auch bei den sequenzspezifischen Proteinen (Takeda *et al.*, 1983) wie das CRP, dem Cro-Protein, dem λ -Repressor, Lac-Repressor (Chakerian & Matthews, 1992), dem Tryptophanrepressor (Shao *et al.*, 1997), und FNR (Lazazzera *et al.*, 1996) zu finden. Auch die Replikationsinitiation durch DnaA (Weigel *et al.*, 1999) läuft nach diesem Muster. Aktivität die Dimerisierung voraussetzt existiert nicht nur bei DNA-Bindeproteinen sondern auch bei einer Reihe von glycolytischen (Torshin, 1999) und bei verschiedenen ATP-bindenden Enzymen.

Der C-terminalen Domäne kommt jedoch nicht nur eine Aufgabe in der DNA-Bindung zu, sondern ist auch für die Oligomerisierung von Bedeutung, die unmittelbare Verbindung der beiden Funktionen wird durch die Mutante an Position 116 deutlich (Spurio *et al.* 1997), die trotz der C-terminalen Lokalisation keine Oligomere bilden kann. Durch die Mutation wird die Sekundärstruktur empfindlich gestört, was die Integrität des Gesamtproteins stört. Vorgeschlagen wurde, daß diese Aminosäure an einem intramolekularen Kommunikationsmechanismus beteiligt ist, bei dem durch Konformationsänderungen beide Domänen miteinander kommunizieren (Spurio

rio *et al.* 1997). Dies muß allerdings anhand mehrerer Mutanten verifiziert werden. In jedem Fall hat die C-terminale Domäne eine Bedeutung für die Proteinstabilität und -integrität.

In Experimenten belegt die Arbeitsgruppe von T. Kawula in Übereinstimmung mit den anderen Modellen, daß die C-terminale Region für die DNA-Bindung notwendig ist. Eine H-NS-Mutante mit Aminosäureaustausch T108I bindet nicht an DNA-Cellulose und an das Promotorfragment von *fimB*, dieser Defizit reicht aber nicht aus, um zur Derepression von *fimB* zu führen. Ein weiterer Hinweis dafür, daß die C-terminale Region nicht ausschließlich für die DNA-Bindung zuständig ist, zeigt die Regulation der Promotorinversion von *fimA*. Für die Inversion sind nur die Aminosäurereste der N-terminalen Region entscheidend, der Vorgang scheint ohne über H-NS vermittelte DNA-Bindung auszukommen. Austausche im C-terminalen Bereich bleiben ohne Auswirkung, jedoch führt das Verkürzen des Proteins vom C-terminalen Ende zu einem defekten Inversionsphänotyp der Inversion von *fimB* (Donato *et al.*, 1999). Das unterstreicht die Bedeutung der C-terminale Domäne für die Proteinintegrität und -stabilität.

Mutanten wie die von Spurio *et al.*, (1997) gefundene an Position 116 und die an Position 108 (Donato & Kawula, 1998) weichen die starre Zuteilung von Funktionen zu bestimmten Domänen des Proteins auf, was mit noch weiteren Untersuchungen gestützt werden muß, aber verdeutlicht, daß die Aktionen von Proteinen dynamischer sind und jedes Modell meist nur für ein bestimmtes Gensystem seine Richtigkeit hat.

4. Funktionsweise von H-NS

Die höchst unterschiedlichen regulatorischen Eigenschaften von H-NS sind in verschiedenen Modellen beschrieben worden, die unabhängig voneinander oder in Kombination die Aktivität von H-NS zu erklären versuchen. Von einem vollständigen Verständnis aller regulatorischen Vorgänge kann man aufgrund der Diversifikation der Aufgaben noch nicht sprechen. H-NS kann als ein Chromosomenorganisator und übergeordneter Modulator beschrieben werden.

4.1 Regulation durch H-NS auf Transkriptionsebene

In den überwiegenden Fällen wirkt H-NS als Repressor (Göransson *et al.*, 1990; Ueguchi *et al.*, 1993; Lucht *et al.*, 1994), jedoch nicht im klassische Sinn, weil zwar die Repression der von *hns* regulierter Gene entfällt, aber die verbleibende Expression noch immer für die Regulation durch andere Regulatoren und der entsprechenden Umweltsignale modulierbar ist (Göransson *et al.*, 1990; May *et al.*, 1990; Dorman & NiBhriain, 1992; Hromockyj *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 1993). Die Aktivierung durch H-NS, die nur bei einer kleinen Anzahl an Genen anzutreffen ist, wurde bisher noch nicht genauer untersucht.

Prinzipiell kann man von drei verschiedenen Möglichkeiten ausgehen, durch die H-NS auf Transkriptionsebene wirken kann.

Zum einen kann H-NS an DNA binden und direkt die Expression von Genen beeinflussen. H-NS wirkt dabei, lokal begrenzt, in dem es den Zutritt der RNAP verhindert (Tippner *et al.*, 1994; Zu-

ber *et al.*, 1994) oder erschwert, RNAP und H-NS stehen hierbei in direkter Konkurrenz um Bindung an die DNA. Direkte Interaktion von H-NS mit RNAP sind bisher nicht bekannt.

Die Repression kann auch durch Polymerisation vieler H-NS-Dimere zu Oligomeren erreicht werden, H-NS agiert als „Transcriptional Silencer“, womit mit der Bezeichnung Silencer nicht bestimmte genetische Elemente beschrieben werden, sondern die Beobachtung, daß H-NS bestimmte Abschnitte im regulatorischen Bereich oder innerhalb des Strukturgens abdeckt und ruhig stellt (Göransson *et al.*, 1990; Forsman *et al.*, 1992). Für die Repression von *proU* konnten beide Wirkungsweisen, sowohl der direkte Einfluß als Repressor (Ueguchi & Mizuno, 1993) als auch die Bildung eines größeren Nukleoproteinkomplex aus mehreren H-NS-Dimeren (Lucht *et al.*, 1994; Tupper *et al.*, 1994) nachgewiesen werden. Ähnlich wie für *proU* konnte auch für *fimB* (Donato *et al.*, 1997) und für *virF* (Falconi *et al.*, 1998) kooperative Bindung nachgewiesen werden. Auch der Effekt, daß erst mit steigender H-NS-Menge in den Experimenten mit den pBAD-Derivaten Repression auftritt, ist ein deutlicher Hinweis, daß die Repression ein Frage der Menge an H-NS ist, die entweder als Monomere oder als Dimere an dem *proU*-Promotor zu höheren Oligomeren aufpolymerisieren.

Für eine Reihe von Promotoren, wie für das *bgl*-Operon und das *papBA*-Operon (Donato & Kawula, 1999), stellt sich die Regulation durch H-NS etwas anders dar. Wie für Punktmutanten im hinteren Drittel bezüglich der Repression des *proU*- und *bgl*-Operon gezeigt werden konnte, sind sie zwar nicht mehr in der Lage *proU*, aber *bgl* zu reprimieren. Punktmutanten im vorderen Drittel verhalten sich bezüglich der Repression beider Operons gleich. Nur die N-terminale Domäne scheint für beide Regulationswege von Bedeutung zu sein. Auch scheint für die DNA-Bindfähigkeit für das Silencing des *bgl*-Operons nicht entscheidend zu sein, weil bei Fragmenten, die keine DNA-Binderegion besaßen, die Repression von *bgl* nicht beeinflusst war (Ueguchi *et al.*, 1996). Hier wäre es denkbar, daß H-NS die Tätigkeit eines anderen beteiligten Faktors vorbereitet und nur als Andockstelle dient.

Zum anderen beeinflusst H-NS die Genexpression indirekt durch Veränderung der topologischen Gesamtorganisation eines bestimmten Abschnittes auf dem Chromosom, die in der Regel durch die Abwesenheit des Proteins hervorgerufen wird, es sich dabei nicht um ein aktives regulatorisches Eingreifen handelt. Meist kommt es zur Änderung des Supercoilings, der helikalen Ganghöhe und der DNA Krümmung die Bildung des offenen Komplexes erschweren oder vollkommen unmöglich machen. Promotoren, die dafür sensitiv sind, können selektiv darauf reagieren (Higgins *et al.*, 1988; Dorman *et al.*, 1990; Hulton *et al.*, 1990; Hinton *et al.*, 1992; Owen-Hughes *et al.*, 1992; Tupper *et al.*, 1994). Die Folge ist, daß sich die Transkription an den betreffenden Promotoren eingestellt wird. Die beschriebenen Änderungen der Superspiralität hat nicht nur lokal begrenzten Einfluß auf einen Promotor, sondern die Topologieänderung hat auch weiter reichende Auswirkungen auf die Konformation des gesamten Nukleoids haben (Tupper *et al.*, 1994). Dabei spielt auch die H-NS-Menge eine Rolle, wie in dieser Arbeit und anderen (Spassky *et al.*, 1984; Spurio *et al.*, 1992) gezeigt, führt Überproduktion von H-NS dazu, daß das Nukleoid stark kondensiert, was über längere Distanz Auswirkungen hat.

Auch trifft für die meisten von H-NS reprimierten Gene zu, daß sie in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen wie Osmolarität, Temperatur, O₂-Verfügbarkeit, pH und Wachstumsphase exprimiert werden. Eine Beteiligung des Supercoilings an der Wahrnehmung der veränderten Umwelt ist vielfach nachgewiesen worden: Osmolarität (Higgins *et al.*, 1988), Temperatur, O₂-Verfügbarkeit (Hsieh *et al.*, 1991; Dorman *et al.*, 1988), pH und Nährstoffgehalt (Balke & Gralle, 1987).

Als drittes kann H-NS als Mitglied eines komplexen Netzwerks die Genexpression verschiedener Gene durch Wirkung auf die Expression bestimmter Regulatoren beeinflussen. Dies können auch Nukleoid-assoziierte Proteine oder sequenzspezifische Regulatoren sein. Weiter kann H-NS diesen weiteren Faktoren den Zutritt zur DNA erschweren oder erleichtern oder den entstandenen Nukleoproteinkomplex als Ganzes stabilisieren (Falconi *et al.*, 1991; Liu & Richardson, 1993). Im Fall des Flagellen-Chemotaxis Regulons wird in *hns*-Mutanten der Aktivator CAP nicht mehr benötigt (Bertin *et al.*, 1994).

4.2 Einfluß auf die Stabilität des Chromosoms

Um die Struktur des Chromosoms nachhaltig zu verändern, sind zwei Fähigkeiten, über die H-NS verfügt, notwendig: Zum einen generell doppelsträngige DNA zu binden, wie in dieser und anderen Arbeiten mehrfach bewiesen worden ist, und zum anderen höher molekulare Nukleokomplexe zu bilden, was eines der Prinzipien mit denen H-NS seine Aktivität zumeist der Transkriptionsregulation entfaltet (van Ulsen *et al.*, 1996; White-Ziegler *et al.*, 1998).

Wie P. Dersch (1995) zeigen konnte, führt die „knock-out“-Mutante *hns206* zu einer erhöhten Frequenz der Excision von Tn10 aus dem *malF* Gen, die untersuchten H-NS-Punktmutanten sind hierzu nicht in der Lage.

Auch wenn der Prozeß der präzisen Excision von Tn10 in *Salmonella typhimurium* durch RecA erhöht ist (Levy *et al.*, 1991), konnte dies nur in Stämmen festgestellt werden, die ein Defekt in dem Excisionsreparatur aufwiesen, in *hns*-Mutanten mit mutiertem *recA*, aber mit intaktem *uvr*-Genen ergab es kein Unterschied zu dem Kontrollstamm. Der Mechanismus, an dem H-NS mitwirkt, läuft ohne Einwirkung von RecA ab.

H-NS hat einen negativen Einfluß auf die Transposition, wie das bisher auch für die Nukleoid-assoziierten Proteine IHF und HU festgestellt wurde (Signon & Kleckner, 1995). Während der Transposition wird ein relativ einfach aufgebauter synaptischer Komplex gebildet, an dem mutmaßlich auch Nukleoid assoziierte Proteine beteiligt sind (Chalmers & Kleckner, 1996). Wie die Ergebnisse mir denen im C-terminalen Ende lokalisierten H-NS-Punktmutanten aussagen, ist scheinbar nicht die DNA-Bindung allein die entscheidende Funktion, die zur eingeschränkten Transpositionshäufigkeit führt.

Für die Funktionsweise von H-NS bei komplexen Umorganisierungsvorgängen wie die Inversion, Rekombination und die Transposition gibt es zur Zeit wenige Hinweise. Zum Teil wird die Vorstellung eines Mechanismus auch durch das sehr heterogene Verhalten erschwert. Während die Transpositionsfrequenz von verschiedenen Transposons, IS-Elementen und des Phagen Mu

(Kano *et al.*, 1993), die Inversionsfrequenz der *TypI*-Fimrien und die spontane Deletionsrate in *hns*-Mutanten drastisch erhöht sind, gilt für die homologe Rekombination das Gegenteil (Dri *et al.*, 1992). Aus dem Verlust an H-NS in *hns*-Mutanten resultiert generell, daß die DNA weniger durch das DNA-Bindeprotein stabilisiert wird und deshalb flexibler und leichter zugänglich für die an den Rearrangements beteiligten Enzyme und Bindeproteinen ist, mit der Folge, daß sich alternative Strukturen ausbilden. Es gibt jedoch für einzelne transposable Elemente, wie das IS5, die von AT-reichen, gekrümmten Regionen flankiert werden, den Nachweis von Interaktion mit H-NS (Muramatsu *et al.*, 1988; Tanaka *et al.*, 1991). So daß prinzipiell H-NS mittels der gleichen DNA-Interaktion wie bei der Transkriptionsregulation auf das chromosomale Rearrangement wirken kann. Die Bildung eines Nukleoproteinkomplexes mit anderen Nukleoid assoziierten Proteinen ist anzunehmen, aber noch nicht im einzelnen geklärt.

Denkbar ist auch, daß H-NS all diese Prozesse nicht durch direkte Interaktion beeinflusst, sondern durch die Wirkung auf die Transkription der jeweils beteiligten Rekombinase, Transposasen oder Invertasen. Für die Inversion des *fimA*-Promotors, ein in seiner Komplexität vergleichbarer Vorgang, konnte dargelegt werden, daß für die Drehung des Promotorfragmentes nicht bestimmte Aminosäuren des C-Terminus entscheidend sind, sondern das C-terminale Ende muß als ganze Einheit vorhanden sein. Auch ist es offensichtlich für die Regulation nicht notwendig, daß H-NS an die DNA bindet. Zusätzlich wird der Prozeß noch durch die H-NS gesteuerte Expression der an der Inversion beteiligten Rekombinase FimB reguliert (Donato & Kawula, 1999). Daß H-NS an manchen physiologischen Prozessen, deren Abläufe besonders komplex sind, auf zwei unterschiedliche Arten eingreifen kann, ist auch für die Regulation der Mobilität gezeigt worden. Neben dem positiven Einfluß auf Transkriptionsebene der Flagellenbiosynthese (Bertin *et al.*, 1994), beeinflusst H-NS durch Bindung an das Flagellenrotorprotein FliG die Rotationsgeschwindigkeit des Flagellums (Donato & Kawula, 1998). Auch hier ist der C-Terminus nicht maßgeblich an dem Prozeß beteiligt.

5. H-NS als übergeordneter Modulator in einem Regulationsnetzwerk

Für das Überleben an sich ändernde Umweltbedingungen muß *Escherichia coli* in der Lage sein sich schnell an die Änderungen anzupassen. Damit die Anpassung schnell von statten geht, ist es für die Zelle entscheidend, daß sie über Regulationsmechanismen verfügt, die eine schnelle Antwort ermöglichen. Der Weg der in den meisten Fällen dazu beschritten wird, ist die Regulation auf Transkriptionsebene. Anfang der 90er Jahre ist gerade in diesem Zusammenhang das Interesse an dem Protein H-NS gestiegen, nachdem man erkannte, daß dieses Protein zusammen mit anderen Regulatoren, meist Aktivatoren, in die Expression einer Vielzahl von Genen eingreift.

Zuvor war dieses Protein nur in Verbindung mit Chromosomstrukturierung und Chromosomstabilität, mit Prozessen wie Rekombination, Replikation und Transposition, beschrieben worden. Nur auf den ersten Blick sind diese beide Aufgabenbereiche strikt voneinander trennbar. Zunehmend stellte sich heraus, daß sich die beiden Bereiche stark tangieren. Zum einen ist H-NS zusam-

men mit anderen Nukleoid assoziierte Proteinen wie Fis, Lrp, IHF, HU und Dps an der Organisation des Genoms beteiligt, aber für die meisten Nukleoid assoziierte Proteinen stellte sich ähnlich wie für H-NS das Mitwirken an Genregulation in Variation des gleichen Themas heraus.

5.1 Regulation der Menge an H-NS

Die intrazelluläre Konzentration von H-NS ist für die Physiologie der Zelle von entscheidender Bedeutung, weil durch eine Änderung der Menge weitreichende Effekte verursacht werden.

Wenn durch Überproduktion *in vivo* zuviel H-NS vorliegt, tritt die Zelle in einen künstlich hervorgerufene Zustand vergleichbar der stationären Phase. Das Nukleoid wird bei fortdauernder Überproduktion kondensiert (Spurio *et al.*, 1992) und die DNA- und RNA-Synthese lahmgelegt, weil Sequenzen von Strukturgenen nicht mehr exponiert werden können. Die Folge ist, daß die Zellen nicht lange überleben. Liegt zu wenig H-NS vor, wie das bei einigen in unsere Arbeitsgruppe isolierten Punktmutationen im regulatorischen Bereich der Fall ist, die zu einer Abschwächung des Kontaktes der RNA-Polymerase und dem Promotor führen (Perraud, 1994), ähnelt der Phänotyp der “knock-out“-Mutante mit den breit gefächerten physiologischen Ausfällen.

Die H-NS-Menge wird durch mehrere Faktoren bestimmt: H-NS reguliert sich auf Transkriptionsebene selbst, so daß die Expression in *hns206* Mutanten um das 5-fache steigt (Falconi *et al.*, 1993; Dersch *et al.*, 1993; Ueguchi *et al.*, 1993). Die Autoregulation der Punktmutanten, wie in dieser Arbeit demonstriert, funktioniert nicht in gleichen Maß wie im Wildtyp, wie auch schon die reduzierte DNA-Bindefähigkeit an DNA-Cellulose erwarten ließ. Die Zellen mit Punktmutationen in *hns* synthetisieren höhere Mengen an H-NS als der Wildtyp, ein eindeutiger Hinweis darauf, daß die Repression des eigenen Gens defekt ist. Die eingeschränkte DNA-Bindefähigkeit, wie auch schon für *proU* gezeigt, reicht für den Erhalt der Funktion nicht aus. Aufgrund der verminderten DNA-Bindefähigkeit eines auf 92 Aminosäuren verkürzten H-NS-Proteins vermuteten Ueguchi *et al.* (1996), daß die Autoregulation in *hns*-Punktmutanten defekt ist.

Weiter wird *hns* durch Fis, das antagonistisch zu H-NS im Promotorbereich bindet und als direkter Aktivator der Repression durch H-NS entgegen wirkt (Falconi *et al.*, 1996). Die *hns* Expression wird bei Kälteschock durch das Kälteschockprotein CspA aktiviert (Brandi *et al.*, 1994). An Umwelt-faktoren wirken Änderungen in der Osmolarität der Umgebung und das rasche Zellwachstum in der exponentiellen Phase induzierend auf die *hns* Expression. Die Synthese ist an die Replikation gekoppelt, was im Hinblick auf die Nukleoidorganisation Sinn macht. Die Autoregulation ist so eingestellt, daß das Verhältnis H-NS:DNA immer gleich ist (Free & Dorman, 1995). Mit Hilfe von Reporterfusionen stellte man einen Anstieg der Transkription (Free & Dorman, 1995; Dersch *et al.* 1993, Ueguchi & Mizuno, 1993) bei Eintritt in der Stationärphase fest, wobei es sich handelt sich um die Anpassung an die Zunahme der DNA pro Zelle bei Eintritt der Zelle in die Phase verlangsamten Wachstums handelt. Die H-NS-Zunahme verhält sich also reziprok zur Wachstumsrate (Afflerbach *et al.*, 1998). Störungen in der Autoregulation werden in der stationären Phase besonders deutlich.

Auch für die in V.3.4 beschriebene dominant-negativen Genprodukte gilt, daß bei ihnen die Autoregulation ausfällt und sich mit fortschreitendem Wachstum akkumulieren, wie das durch Williams *et al.* (1996) beschrieben wird. In den Komplementationsexperimenten mit den pBAD-Derivaten ist zudem noch eine weitere Beobachtung zu manchen, daß eine bestimmte Anzahl an Monomeren vorhanden sein muß, die dann Dimere und Tetramere ausbilden und so effektiv *proU* zu reprimieren. Durch die pBAD-Derivate, die ein *hns* Allel mit Punktmutation tragen, kann Repression durch einen unphysiologischen H-NS-Überschuß erreicht werden. Dieser Überschuß wird erst in der stationären Phase erreicht, jedoch nicht in den kürzere Zeit gewachsenen, exponentiellen Zellen.

Der Bereich, in dem die Menge physiologisch fein reguliert wird, ist nur sehr schmal und geringfügige Änderungen haben weitreichende Konsequenzen. Die Präferenz zu gebogener DNA ist nur geringfügig höher als die zu nicht gebogener unspezifischer DNA (Ueguchi *et al.* 1996).

H-NS kann innerhalb eines relativ kleinen Mengenbereichs unterschiedlichste Wirkung erzielen. Liegt H-NS in geringer Menge vor, werden erst die H-NS-sensitiven Promotoren besetzen und erst dann mit zunehmender Menge, wie in den Retardierungssassays deutlich sichtbar, werden die DNA-Kontakte unspezifischer und weniger ortsspezifisch, und können große Arreale ruhig stellen, was dem zufolge globale Auswirkung hat.

5.2 H-NS reguliert durch die Bildung von Homo- und Heteromere

Wie in dieser Arbeit durch Gelretardierungsexperimenten gezeigt werden konnte, interagieren die Proteine H-NS und StpA mit dem Promotor des jeweils anderen Gens. Damit ist die Voraussetzung für die gegenseitige Transkriptionsregulation gegeben. Die Kreuzregulation der beiden Gene (Sonden & Uhlin 1996; Zhang *et al.*, 1996) eröffnet somit Möglichkeiten für die Feinregulation in der Zelle. Die beiden Proteine regulieren sich gegenseitig in ihrer Menge und wirken jeweils als Homodimer (-tetramer) auf die verschiedensten Gene. Beide Proteine regulieren zwar unabhängig voneinander, aber es stellt sich in zwei-dimensionalen Proteingelen (Zhang *et al.*, 1996) heraus, daß außer den jeweils nur von H-NS bzw. StpA regulierten Genprodukten auch einige Proteine beide Regulatoren brauchen. Das kann zwar jeweils getrennt voneinander als Homomer erfolgen, aber Hybridmoleküle sind *in vitro* durch Crosslinking-Experimente nachgewiesen (Williams *et al.*, 1996), so daß H-NS/StpA Hybridmoleküle eine Rolle in der Regulation einer distinkten Gruppe von Genen spielen könnten.

Auch können dominant-negative Allele von *hns* die Ausprägung des StpA-Wildtyp-Phänotyp, beispielsweise *proU* zu reprimieren, verhindern. Die Ausprägung der negativen Dominanz kann nur über die Protein-Protein-Interaktionen von Hybridmolekülen erklärt werden. Für die dominant negativen *stpA* Allele gilt das entsprechend (Williams *et al.*, 1996). Die Konsequenz daraus wäre, daß StpA, das meist in geringerer Konzentration in der Zelle vorliegt überwiegend an H-NS gebunden vorliegen würde und nur die StpA spezifischen Funktionen ausführen könnte, wenn es im Überschuß vorliegt.

Für die Bildung von Heteromeren bei Eukaryonten ist Jun/Fos das prominentestes Beispiel (Ransone *et al.*, 1990), aber auch in *E. coli* gibt es eine Reihe von Heteromeren: HU/IHF oder Fis/H-NS bei der Regulation der Expression von *rrnB*. Die antagonistische Wirkung von Fis und H-NS besteht darin, daß beide Proteine in die DNA Konformationen einführen, die eine Bindung des jeweils anderen Regulators ausschließt. Es wird angenommen, daß Fis-Dimere durch heteromere Fis/H-NS-Dimere und anschließend durch H-NS-Dimere ersetzt werden. Der Promotor geht hierbei von dem aktiven Zustand fließend in den reprimierten Zustand über (Afflerbach *et al.*, 1999).

Für die genannten Regulationsprozesse spielt das Mengenverhältnis von H-NS und StpA zueinander eine Rolle, leichte Verschiebungen in sensiblen Systemen haben schwerwiegende Konsequenzen. Durch die Regulierung mit DsrA (Sledjeski *et al.*, 1996) wird beispielsweise das Mengenverhältnis zugunsten zu StpA verschoben. DsrA ist eine untranslatierte RNA einer Länge von 87 Nukleotiden, die mit der RNA von H-NS interagiert und somit als Antagonist der Proteinsynthese wirkt. Dabei kommt es gleichzeitig zu einem Anstieg der StpA Menge, weil die Transkriptionsrepression durch H-NS entfällt. Ein weiterer Antagonist zu H-NS ist das 5.5 Genprodukt des Phagen T7, das auch H-NS aus dem Gleichgewicht entfernt (Liu & Richardson, 1993). Ein weiterer Angriffspunkt sind Proteasen, die durch Spaltung nur eines Proteins das Verhältnis ändern (Johansson, *et al.*, 1999) und der Einfluß der Wachstumsphase. H-NS liegt nach neuere Untersuchungen nur in der früheren Stationärphase in deutlich größeren Mengen als StpA vor (Talukder *et al.*, 1999).

Zu weiteren Implikationen für den Regulationsmechanismus von H-NS, StpA und H-NS/StpA führt die Bestätigung, daß Tetramere die überwiegend physiologisch vorliegende Form (Ceschini *et al.*, 2000) und somit auch die aktive Form ist. Wenn sich Hybridmoleküle *in vivo* bestätigen, wäre noch mehr Kombinations- und Feinregulationsmöglichkeit durch gemischte Tetramere im Verhältnis 2:2, 1:3 oder 3:1 gegeben. Dem DnaK ähnlichen Protein Hsc66, mutmaßlich ein Chaperon, wird eine Beteiligung an der Veränderung der Konformation von H-NS-Monomeren hin zu Multimeren zu geschrieben (Kawula & Lelivelt, 1994).

5.3 H-NS agiert im Zusammenspiel mit verschiedenen Effektoren

Als Teil eines Netzwerkes H-NS wird von vielen Faktoren reguliert und nimmt Einfluß auf viele Regulationswege. Mehrere Faktoren, die auf verschiedenen Ebenen und Zeitpunkten in die Regulation eingreifen, erlauben feiner abgestimmte Regulation.

Durch die Veränderung der Promotorarchitektur durch die Bildung von Loopstrukturen (Raibaud, 1989; Lobell & Schleif, 1990; Travers & Muskhelishvili, 1998) zur Annäherung von verschiedenen Aktivatoren und die Bildung eines Nukleoproteinkomplexes (Muskhelishvili *et al.*, 1995) sind ein vielfach variiertes Thema in der Transkriptionsregulation (Perez-Martin & De Lorenzo, 1997). Die Fähigkeit, DNA aktiv zu biegen (Spurio *et al.*, 1997), liefert hierzu die architektonischen Voraussetzungen. Für H-NS bedeutete dies ein großes Spektrum an Interaktionsmöglichkeiten (Abb. 38).

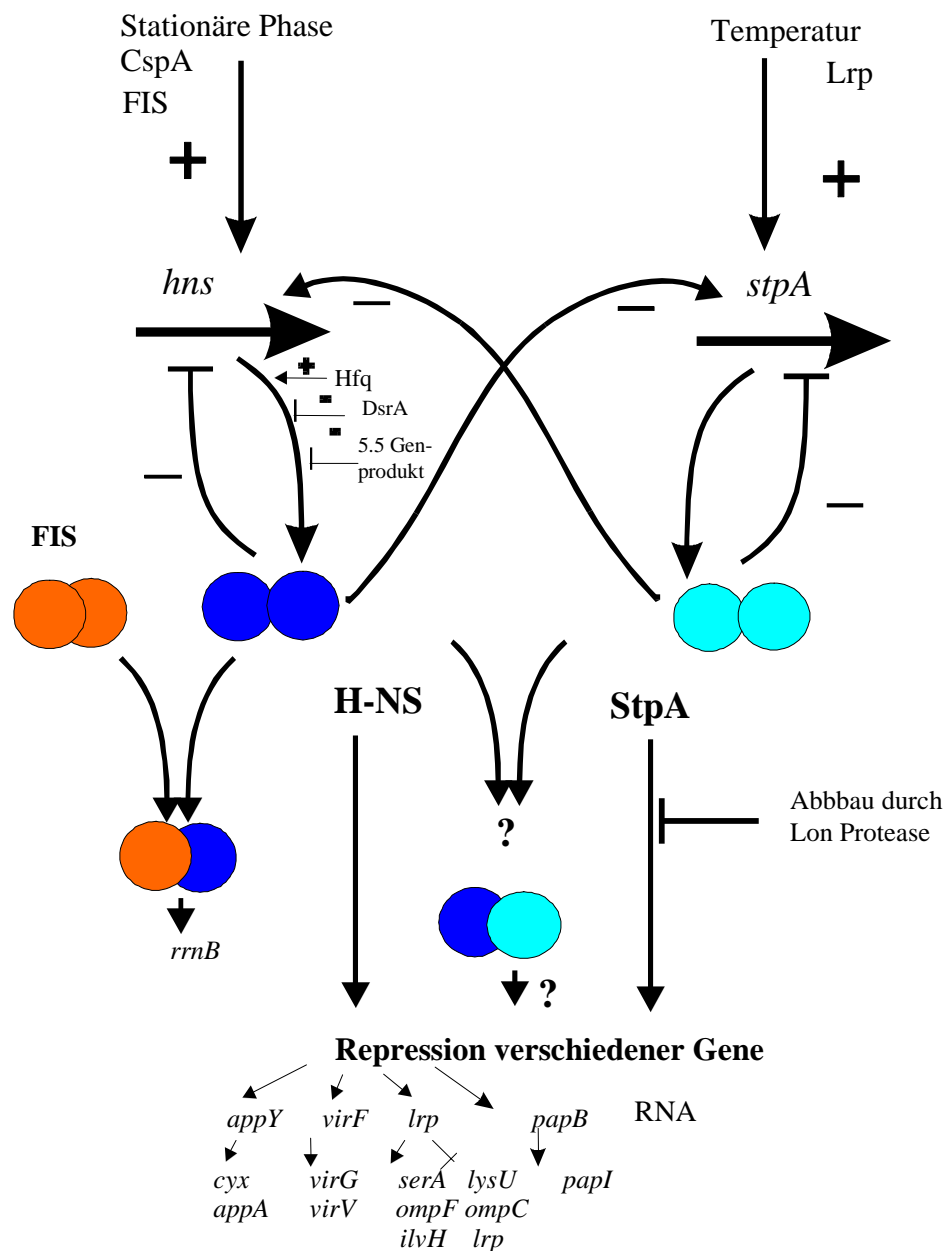


Abb. 38: Modell der verschiedenen Interaktionen von H-NS mit anderen Regulatoren

Das Modell veranschaulicht eine Auswahl der bekannten Interaktionen, durch die H-NS reguliert und seinerseits reguliert wird. Es faßt Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen zusammen.

Globale Aktivatoren wie CRP oder systemgebundene Aktivatoren wie AraC und VirF oder auch verschiedenen Nukleoid assoziierte Proteine wie IHF und Fis sind dabei häufig Antagonisten zu H-NS. Der antagonistischen Wirkung liegt zugrunde, daß die Bindestellen dieser *trans*-aktivierenden Regulatorproteine generell in den AT-reichen, *cis*-aktiven, für H-NS hochaffinen Regionen lokalisiert sind.

Neben dem generellen Sigmafaktor σ^{70} sind prozeßspezifisch auch verschiedene alternative σ -Faktoren an der Transkriptionsinitiation wie σ^S (Hengge-Aronis, 1996) beteiligt, wie beispielsweise an den beiden Promotoren des *proU* Operons: An P1 σ^S und an P2 σ^{70} zusammen mit HU

und IHF (Dattananda *et al.*, 1991; Gowrishankar & Manna, 1996). Die Expression von *proU* ist auch ein Beispielen, in denen RpoS und H-NS zusammen regulieren.

Durch die Abwesenheit von H-NS wird die Menge an RpoS erhöht, weil die RpoS-Synthese posttranskriptionell durch H-NS reprimiert wird (Barth *et al.*, 1995; Yamashino *et al.*, 1995), so daß eine Reihe der durch 2D-Gele der Regulation durch H-NS zugeschriebenen Gene eigentlich RpoS reguliert sind. Das trifft für viele Gene zu, die osmotisch reguliert oder in der Stationärphase induziert werden (Hengge-Aronis, 1996). Außer durch H-NS wird RpoS durch Hfq (HF-1) und DsrA (Sledjeski *et al.*, 1996) reguliert und die Translation von RpoS begünstigen. Beide wirken auch auf H-NS, DsrA als Antagonist, wobei hierbei jedoch unterschiedliche Regionen von DsrA als an der Regulation von H-NS beteiligt sind (Lease *et al.*, 1998; Majdalani *et al.*, 1998) und Hfq stabilisierend auf Proteinebene (Kajitani *et al.*, 1994; Muffler *et al.*, 1996). So sind H-NS und RpoS durch eine Reihe gleicher Faktoren reguliert.

Auch kann, wenn an Regulationswegen verschiedene Nukleoid-assoziierte Proteine zusammenwirken, die Zelle durch Substitution eines Nukleoid-assoziierte Protein durch ein anderes, wie für H-NS, HU und IHF bekannt, Ausfälle von essentiellen Funktionen aufgefangen, erst der Ausfall aller drei Proteine (Yasuzawa *et al.*, 1992) ist letal.

Auch kann H-NS innerhalb eines Regulationsweges an verschiedenen Punkten angreifen. Für die Regulation der Expression der Typ 1 Fimbrien, die durch Promotorinversion erfolgt, greift H-NS sowohl als Transkriptionsregulator der FimB Rekombinase als auch direkt durch Protein-Protein-Interaktion am Ort der Inversion ein (O'Gralla & Dorman, 2000). Eine solche doppelte Beteiligung zeigt sich auch bei der Regulation der Motilität der Flagellen. H-NS wirkt auf die Flagellenbiosynthesegene (Bertin *et al.*, 1994) und interagiert mit einem Flagellenmotorprotein FliG, wodurch der Motor stabilisiert wird (Donato & Kawula, 1998).

Durch die Mannigfaltigkeit der verschiedenen Prozesse an denen H-NS beteiligt ist und die unterschiedlichen Möglichkeiten dieses Proteins regulierend zu wirken, ist der Zelle mit H-NS ein Werkzeug gegeben, durch das sie unter Berücksichtigung der Umweltbedingungen und den Anforderungen der verschiedenen Habitate ihren Stoffwechsel fein regulieren kann.

VI. Ausblick

Wie für ein verkürztes H-NS-Molekül herausgefunden wurde, kann H-NS sich eines Adaptermoleküles bedienen. Im Fall der Regulation des *bgl* Operons ermöglicht die Mithilfe des Sigmafaktors RpoS, daß die komplette Funktionsweise von H-NS wiederhergestellt wird (Ohta *et. al.*, 1999).

Weiter könnte man den *in vivo* Nachweis der direkten Interaktion von Regulatorproteinen mit einem bakteriellem „two hybrid system“ (Karimova *et. al.*, 1998) leisten. Wobei zwei angenommene Regulatorproteine an komplementäre Fragmente der Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* fusioniert werden. Falls die beiden Proteine interagieren, wird das katalytische Zentrum des Enzyms funktionell rekonstituiert und so daß sich das Ereignis sich als Enzymaktivität messen läßt.

Auch könnte man die der Existenz von H-NS/StpA-Hybridmolekülen *in vivo* nachweisen, womit die Spekulation über die Feinregulation der Zelle Konkretisierung erfahren würde. Auch wäre es in dem Zusammenhang von Interesse wie Häufigkeit die gemischten Dimere auftreten, ob sie wie bei HU α und HU β die Regel oder ob sie eher die Ausnahme sind. HU α und HU β könnten das analoge Beispiel für die Regulation mittels dreier Mischformen sein (Dorman *et. al.*, 1999).

Auch wäre zu prüfen, ob die Bildung von Dimeren und Chimärenproteinen infolge einer von unterschiedlichen Wachstumsphasen oder Umwelteinflüsse abhängigen Transkription wie für HU α und HU β bekannt ist (Claret & Rouviere-Yaniv, 1996; Claret & Rouviere-Yaniv, 1997), auch für H-NS und StpA zutrifft und eine entlang des Wachstums fein abgestimmte Regulation ermöglichen würde (Dorman *et al.*, 1999).

Dabei müssen auch die biochemischen und DNA- und RNA-Bindeeigenschaften der Mischform näher untersucht werden. Für HU und IHF sind solche Chimären nachgewiesen (Goshima *et. al.*, 1992) und auch für H-NS und FIS -wie bereits erwähnt- sind solche Chimären postuliert worden (Afflerbach *et. al.*, 1999). Weiter wäre zu klären, inwiefern das dritte Protein MdbA, das Homologien zu H-NS und StpA besitzt, Wechselwirkungen mit den beiden näher untersuchten Proteinen hat (Dorman *et. al.*, 1999) und ob es ein weiteres Modul für die Feinregulation sein könnte.

Nachdem es gelungen ist, von einem auf 67 Aminosäuren verkürzten Protein verschiedene H-NS-Isoformen zu isolieren, mußte man sich der Aufklärung widmen, ob diesen Formen auch unterschiedliche Funktion zukommt, und von welchen äußeren Faktoren die Modifikation abhängt.

Weiter müßte auch der Wirkungsmechanismus von H-NS und StpA weiter aufgeklärt werden, wie die Transkription reprimiert wird und welche Rolle die RNA-Polymerase darin spielt. Auch für die Aktivierung existiert noch keine schlüssige Erklärung.

VII. Literatur

- Abaibou, H., J. Pommier, S. Benoit, G. Giordano & M. A. Mandrandberthelot** (1995): Expression and characterization of the *Escherichia coli fdo* Locus and a possible physiological role for aerobic formate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **177**: 7141-7149.
- Adams, D. E., E. M. Shekhtman, E. L. Zechiedrich, M. B. Schmid & N. R. Cozzarelli** (1992): Role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell* **71**: 277-288.
- Adhya, S., M. Gottesman, S. Garges & A. Oppenheim** (1993): Promotor resurrection by activators- A Minireview. *Gene* **132**: 1-6.
- Afflerbach, H., O. Schroder & R. Wagner** (1998): Effects of the *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS on rRNA synthesis *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **28**: 641-53.
- Afflerbach, H., O. Schroder & R. Wagner** (1999): Conformational changes of the upstream DNA mediated by H-NS and FIS regulate *E. coli* RnB P1 promoter activity. *J. Mol. Biol.* **286**: 339-53.
- Almirón, M., A. Link, D. Furlong & R. Kolter** (1992): A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *E. coli*. *Genes Dev.* **6**: 2646-2654.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman** (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Ambartsoumian, G., R. Dari, R. T. Lin & E. B. Newman** (1994): Altered amino acid metabolism in *lrp* mutants of *Escherichia coli* K12 and their derivatives. *Mol. Microbiol.* **140**: 1737-1744.
- Appleman, J. A., W. Ross, J. Salomon & R. L. Gourse** (1998): Activation of *Escherichia coli* rRNA transcription by FIS during a growth cycle. *J. Bacteriol.* **180**: 1525-32.
- Arnqvist, A., A. Olsen & S. Normark** (1994): Sigma(S)-dependent growth-phase induction of the *csgB* A promoter in *Escherichia coli* can be achieved *in vivo* by Sigma(70) in the absence of the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **13**: 1021-1032.
- Aronshtam, A. & M. G. Marinus** (1996): Dominant negative mutator mutations in the *mutL* gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **24**: 2498-504.
- Atlung, T., S. Sund, K. Olesen & L. Brondsted** (1996): The histone-like protein H-NS acts as a transcriptional repressor for expression of the anaerobic and growth phase activator App Y of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 3418-3425.
- Atlung, T. & H. Ingmer** (1997): H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* **24**: 7-17.
- Baba, T., T. Taura, T. Shimoike, Y. Akiyama, T. Yoshihisa & K. Ito** (1994): A cytoplasmic domain is important for the formation of a secY-sece - translocator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 4539-4543.
- Bachmann, B. J.** (1990): Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**: 130-197.
- Balke, V. L. & J. D. Gralla** (1987): Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 4499-4506.
- Ball, C. A., R. Osuna, K. C. Ferguson & R. C. Johnson** (1992): Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 8043-8056.
- Barron, A., G. May, E. Bremer & M. Villarejo** (1986): Regulation of envelope protein composition during adaptation to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **167**: 433-438.
- Barry, C. E., S. F. Hayes & T. Hackstadt** (1992): Nucleoid condensation in *Escherichia coli* that express a chlamydial histone homolog. *Science* **256**: 377-379.
- Barth, M., C. Marschall, A. Muffler, D. Fischer & R. Hengge-Aronis** (1995): Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma(S) and many sigma(S)-dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 3455-3464.
- Battista, J. R., T. Ohta, T. Nohmi, W. Sun & G. C. Walker** (1990): Dominant negative *umuD* mutations decreasing RecA-mediated cleavage suggest roles for intact UmuD in modulation of SOS mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7190-7194.

- Beckett, D., K. S. Koblan & G. K. Ackers** (1991): Quantitative study of protein association at picomolar concentrations: the lambda phage cI repressor. *Anal. Biochem.* **196**: 69-75.
- Bensaid, A., A. Almeida, K. Drlica & J. Rouviere-Yaniv** (1996): Cross-talk between topoisomerase I and HU in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **256**: 292-300.
- Berry, A., J. D. DeVault & A. M. Chakrabarty** (1989): High osmolarity is a signal for enhanced *algDI* transcription in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Bacteriol.* **171**: 2312-2317.
- Bertin, P., P. Lejeune, C. Laurent-Winter & A. Danchin** (1990): Mutations in *bglY*, the structural gene for the DNA-binding protein H1, affect expression of several *Escherichia coli* genes. *Biochimie* **72**: 889-891.
- Bertin, P., P. Lejeune, C. Colson & A. Danchin** (1992): Mutations in *bglY*, the structural gene for the DNA-binding protein H1 of *Escherichia coli*, increase the expression of the kanamycin resistance gene carried by plasmid pGR71. *Mol. Gen. Genet.* **233**: 184-192.
- Bertin, P., E. Terao, E. H. Lee, P. Lejeune, C. Colson, A. Danchin & E. Collatz** (1994): The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 5537-5540.
- Bertin, P., N. Benhabiles, E. Krin, C. Laurent-Winter, C. Tendeng, E. Turlin, A. Thomas, A. Danchin & R. Brasseur** (1999): The structural and functional organization of H-NS-like proteins is evolutionarily conserved in gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **31**: 319-29.
- Bétemier, M., V. Lefrère, C. Koch, R. Alazard & M. Chandler** (1989): The *Escherichia coli* protein: Fis specific binding to the ends of phage Mu DNA and modulation of phage growth. *Mol. Microbiol.* **3**: 459-468.
- Bianchi, M. E.** (1994): Prokaryotic HU and eukaryotic HMG1 - A kinked relationship. *Mol. Microbiol.* **14**: 1-5.
- Biek, D. P. & S. N. Cohen** (1992): Propagation of pSC101 plasmids defective in binding of integration host factor. *J. Bacteriol.* **174**: 785-792.
- Bliska, J. & N. Cozzarelli** (1987): Use of site-specific recombination as a probe of DNA structure and metabolism *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **194**: 89-97.
- Boccard, F. & P. Prentki** (1993): Specific interaction of IHF with RIBS, a class of bacterial repetitive DNA elements located at the 3' end of transcription units. *EMBO J.* **12**: 5019-5027.
- Boch, J., B. Kempf, R. Schmid & E. Bremer** (1996): Synthesis of the osmoprotectant glycine betain in *Bacillus subtilis*: Characterization of the *gbsAB* genes. *J. Bacteriol.* **178**: 5121-5129.
- Bohrmann, B., W. Villiger, R. Johansen & E. Kellenberger** (1991): Coralline shape of the bacterial nucleoid after cryofixation. *J. Bacteriol.* **173**: 3149-3158.
- Bonnefoy, E. & J. Rouvière-Yaniv** (1991): HU and IHF, two homologous histone-like proteins of *Escherichia coli*, form different protein-DNA complexes with short DNA fragments. *EMBO J.* **10**: 687-696.
- Bonnefoy, E. & J. Rouvière-Yaniv** (1992): HU, the major histone-like protein of *E. coli*, modulates the binding of IHF to *oriC*. *EMBO J.* **11**: 4489-4496.
- Bonnefoy, E., M. Takahashi & J. R. Yaniv** (1994): DNA-binding parameters of the HU protein of *Escherichia coli* to cruciform DNA. *J. Mol. Biol.* **242**: 116-129.
- Borst, D. W., R. M. Blumenthal & R. G. Matthews** (1996): Use of an *in vivo* titration method to study a global regulator: effect of varying Lrp levels on expression of *gltBDF* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 6904-12.
- Bouvier, J., S. Gordia, G. Kampmann, R. Lange, R. Hengge-Aronis & C. Gutierrez** (1998): Interplay between global regulators of *Escherichia coli*: effect of RpoS, Lrp and H-NS on transcription of the gene *osmC*. *Mol. Microbiol.* **28**: 971-80.
- Braaten, B. A., J. V. Platko, M. W. van der Woude, B. H. Simons, F. K. de Graaf, J. M. Calvo & D. A. Low** (1992): Leucine-responsive regulatory protein controls the expression of both the *pap* and *fan* pili operons in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4250-4.
- Bracco, L. D., D. Kotlarz, A. Kolb, S. Diekmann & H. Buc** (1989): Synthetic curved DNA sequences can act as transcriptional activators in *E. coli*. *EMBO J.* **8**: 4289-4296.
- Brachmann, R. K., M. Vidal & J. D. Boeke** (1996): Dominant-negative p53 mutations selected in yeast hit cancer hot spots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4091-5.

- Bradford, M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brakenhoff, G. J., P. Blom & P. Barends** (1979): Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses. *J. Microsc.* **117**: 219-232.
- Bramhill, D. & A. Kornberg** (1988): A model of initiation at origins of replication. *Cell* **915-921**:
- Brandi, A., C. L. Pon & C. O. Gualerzi** (1994): Interaction of the main cold shock protein CspA of *Escherichia coli* with the promoter region of HNS. *Biochimie* **76**: 1090-1098.
- Brandi, A., R. Spurio, C. O. Gualerzi & C. L. Pon** (1999): Massive presence of the *Escherichia coli* 'major cold-shock protein' CspA under non-stress conditions. *EMBO J.* **18**: 1653-9.
- Broyles, S. S. & D. E. Pettijohn** (1986): Interaction of the *Escherichia coli* HU with DNA. Evidence for formation of nucleosome-like structures with altered helical pitch. *J. Mol. Biol.* **187**: 47-60.
- Buggy, J. J., M. W. Sganga & C. E. Bauer** (1994): Characterization of a light-responding trans-activator responsible for differentially controlling reaction center and light-harvesting-I gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **176**: 6936-43.
- Bykowski, T. & A. Sirko** (1998): Selected phenotypes of *ihf* mutants of *Escherichia coli*. *Biochimie* **80**: 987-1001.
- Cairney, J., C. F. Higgins & I. R. Booth** (1984): Proline uptake through the major transport system PutP of *Salmonella typhimurium* is coupled to sodium ions. *J. Bacteriol.* **160**: 22-27.
- Calvo, J. M. & R. G. Matthews** (1994): The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **58**: 466-490.
- Carter, P., H. Bedouelle & G. Winter** (1985): Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucl. Acids Res.* **13**: 4431-4443.
- Casadaban, M. J.** (1976): Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using the bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**: 541-555.
- Cazaux, C., F. Larminat, G. Villani, N. P. Johnson, M. Schnarr & M. Defais** (1994): Purification and biochemical characterization of *Escherichia coli* RecA proteins mutated in the putative DNA binding site. *J. Biol. Chem.* **269**: 8246-8254.
- Ceschini, S., G. Lupidi, M. Coletta, C. L. Pon, E. Fioretti & M. Angeletti** (2000): Multimeric self-assembly equilibria involving the histone-like protein H-NS. A thermodynamic study. *J. Biol. Chem.* **275**: 729-34.
- Chakerian, A. E. & K. S. Matthews** (1992): Effect of lac repressor oligomerization on regulatory outcome. *Mol. Microbiol.* **6**: 963-8.
- Chalmers, R. M. & N. Kleckner** (1996): IS10/Tn10 transposition efficiently accommodates diverse transposon end configurations. *EMBO J.* **15**: 5112-22.
- Claret, L. & J. Rouviere-Yaniv** (1996): Regulation of HU α and HU β by CRP and FIS in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **263**: 126-39.
- Claret, L. & J. Rouviere-Yaniv** (1997): Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*: the heterodimer is required for long term survival. *J. Mol. Biol.* **273**: 93-104.
- Colonna, B., M. Casalino, P. A. Fradiani, C. Zagaglia, S. Naitza, L. Leoni, G. Prosseda, A. Coppo, P. Ghelardini & M. Nicoletti** (1995): H-NS regulation of virulence gene expression in enteroinvasive *Escherichia coli* harboring the virulence plasmid integrated into the host chromosome. *J. Bacteriol.* **177**: 4703-4712.
- Corazelli, N. R.** (1980): DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* **207**: 953-960.
- Craig, N. & H. A. Nash** (1984): *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. *Cell* **39**: 707-716.
- Creighton, T. E.** (1993). *Proteins*, 2nd edition, W. H. Freeman and Co., New York.
- Crooke, E., M. Akiyama, N. N. Rao & A. Kornberg** (1994): Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**: 6290-6295.
- Csonka, L. N. & A. D. Hanson** (1991): Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Ann. Rev. Microbiol.* **45**: 569-606.

- Csonka, L. N. & W. Epstein** (1995): Osmoregulation. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, pp. 1210-1223, F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger, eds., ASM Press, Washington, D. C.
- Cukier-Kahn, R., M. Jacquet & F. Gros** (1972): Two heat-resistant, low molecular weight proteins from *Escherichia coli* that stimulate DNA-directed RNA synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**: 3643-3647.
- Cusick, M. E. & M. Belfort** (1998): Domain structure and RNA annealing activity of the *Escherichia coli* regulatory protein StpA. *Mol. Microbiol.* **28**: 847-57.
- Dagberg, B. & B. E. Uhlin** (1992): Regulation of virulence-associated plasmid genes in enteroinvasive *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 7606-7612.
- Dattananda, C. S., K. Rajkumari & J. Gowrishankar** (1991): Multiple mechanisms contribute to osmotic inducibility of *proU* operon expression in *Escherichia coli*: Demonstration of two osmoresponsive promoters and of a negative regulatory element within the first structural gene. *J. Bacteriol.* **173**: 7481-7490.
- Davidson, A. L. & H. Nikaido** (1991): Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**: 8946-9851.
- Davis, C. R., T. J. Richman, S. B. Deliduka, J. O. Blaisdell, C. C. Collins & D. I. Johnson** (1998): Analysis of the mechanisms of action of the *Saccharomyces cerevisiae* dominant lethal *cdc42G12V* and dominant negative *cdc42D118A* mutations. *J. Biol. Chem.* **273**: 849-58.
- Dayhoff, M. O., R. M. Schwartz & B. C. Orcutt** (1978): A model of evolutionary change in proteins. In *Atlas of protein sequence and structure*, pp. 345-352, M. O. Dayhoff, ed. National Biomedical Research Foundation, Washington D.C.,
- De Biase, D., A. Tramonti, F. Bossa & P. Visca** (1999): The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli* : role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Mol. Microbiol.* **32**: 1198-211.
- Defez, R. & M. DeFelice** (1981): Cryptic operon β -glycoside metabolism in *E. coli* K-12 genetic evidence for a regulatory protein. *Genetics* **97**: 11-25.
- Deretic, V. & W. M. Konyecsni** (1990): A procaryotic regulatory factor with a histone H1-like carboxy-terminal domain: clonal variation of repeats within *algP*, a gene involved in regulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **172**: 5544-5554.
- Dersch, P., K. Schmidt & E. Bremer** (1993): Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation. *Mol. Microbiol.* **8**: 875-889.
- Dersch, P., J. M. Lucht & E. Bremer** (1993): Einfluß des Nucleoid-assozierten DNA-Bindeprotein H-NS auf die bakterielle Genexpression. In *Modulation der Virulenz von Krankheitserregern*, pp.
- Dersch, P., S. Kneip & E. Bremer** (1994): The nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is required for the efficient adaptation of *Escherichia coli* K-12 to a cold environment. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 255-259.
- Dersch, P., H. Fsihi & E. Bremer** (1994): Low-copy-number T7 vectors for selective gene expression and efficient protein overproduction in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**: 19-26.
- Dersch, P.** (1995): Molekularbiologische Charakterisierung des Nukleoid-assozierte DNA-Bindeprotein H-NS aus *Escherichia coli*. .
- Diderichson, B.** (1980): *cur-I*, a mutation affecting the phenotype of *sup*⁺ strains of *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* **180**: 425-428.
- DiGate, R. J. & K. J. Marians** (1989): Molecular cloning and DNA sequence analysis of *E. coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J. Biol. Chem.* **264**: 17924-17930.
- Dill, K. A.** (1990): Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* **29**: 7133-7155.
- Ditto, M. D., D. Roberts & R. A. Weisberg** (1994): Growth phase variation of integration host factor level in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 3738-3748.
- Donato, G. M., M. J. Lelivelt & T. H. Kawula** (1997): Promoter-specific repression of *fimB* expression by the *Escherichia coli* nucleoid-associated protein H-NS. *J. Bacteriol.* **179**: 6618-25.

- Donato, G. M. & T. H. Kawula** (1998): Enhanced binding of altered H-NS protein to flagellar rotor protein FliG causes increased flagellar rotational speed and hypermotility in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **273**: 24030-6.
- Donato, G. M. & T. H. Kawula** (1999): Phenotypic analysis of random *hns* mutations differentiate DNA-binding activity from properties of *fimA* promoter inversion modulation and bacterial motility. *J. Bacteriol.* **181**: 941-8.
- Dorman, C. J., G. C. Barr, N. NiBhriain & C. F. Higgins** (1988): DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. *J. Bacteriol.* **170**:
- Dorman, C. J., N. NiBhriain & C. F. Higgins** (1990): DNA supercoiling and environmental regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **3**: 531-540.
- Dorman, C. J. & N. NiBhriain** (1992): Thermal regulation of *fimA*, the *Escherichia coli* gene coding for the type 1 fimbrial subunit protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **78**: 125-30.
- Dorman, C. J. & N. NiBhriain** (1993): DNA topology and bacterial virulence gene regulation. *Trends Microbiol.* **1**: 92-99.
- Dorman, C. J., N. C. Nolan & S. G. J. Smith** (1996): Control of type1 fimbrial expression by a random genetic switch in *Escherichia coli*.
- Dorman, C. J., J. C. Hinton & A. Free** (1999): Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends Microbiol.* **7**: 124-8.
- Dover, N., C. F. Higgins, O. Carmel, A. Rimón, E. Pinner & E. Padan** (1996): Na^+ induced transcription of *nhaA*, which encodes an Na^+/H^+ antiporter in *Escherichia coli*, is positively regulated by *nhaR* and affected by *hns*. *J. Bacteriol.* **178**: 6508-6517.
- Dri, A. M., P. L. Moreau & J. Rouviere-Yaniv** (1992): Role of the histone-like proteins OsmZ and HU in homologous recombination. *Gene* **120**: 11-6.
- Dri, A.-M. & P. L. Moreau** (1993): Phosphate starvation and low temperature as well UV irradiation transcriptionally induce the *Escherichia coli* LexA-controlled gene *sfiA*. *Mol. Microbiol.* **8**: 697-706.
- Drlica, K.** (1987): The nucleoid. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, pp. 91-103, F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H. E. Umbarger, eds., Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C.
- Drlica, K. & M. Riley** (1990). The bacterial chromosome, Am. Soc. Microbiol. Press, Washington, D.C.
- D'Ari, R., R. T. Lin & E. B. Newman** (1993): The leucine-responsive regulatory protein: more than a regulator? *Trends Biochem.* **18**: 260-263.
- Eichler, K., A. Buchet, F. Bourgis, H. P. Kleber & M. A. Mandrand-Berthelot** (1995): The *fix* *Escherichia coli* region contains four genes related to carnitine metabolism. *J. Basic Microbiol.* **35**: 217-227.
- Eichler, K., A. Buchet, R. Lemke, H. P. Kleber & M. A. Mandrand-Berthelot** (1996): Identification and characterization of the *caiF* gene encoding a potential transcriptional activator of carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 1248-57.
- Engelberg, E., R. L. Anderson, R. Neinberg, P. Lee, P. Hoffee, G. Huttenhauer & H. Boyer** (1962): L-Arabinose-sensitive, L-ribulose-5-phosphat 4-epimerase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **84**: 137-146.
- Eriksson, A. E. & B. W. Matthews** (1992): Response of a protein structure to cavity creating mutations and its relation to hydrophobic effect. *Science* **255**: 178-183.
- Ernsting, B. R., J. W. Denninger, R. M. Blumenthal & R. G. Matthews** (1993): Regulation of the *gltdf* operon of *Escherichia coli* - how is a leucine-insensitive operon regulated by the leucine-responsive regulatory protein. *J. Bacteriol.* **175**: 7160-7169.
- Ernstings, B. R., M. R. Atkinson, A. J. Ninfa & R. G. Matthews** (1992): Characterization of the regulon controlled by leucine-responsive regulatory protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 1109-1118.
- Falconi, M., M. T. Gualtieri, A. La Teana, M. A. Losso & C. L. Pon** (1988): Proteins from the prokaryotic nucleoid: primary and quaternary structure of the 15-kD *Escherichia coli* DNA binding protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **2**: 323-9.

- Falconi, M., V. McGovern, C. Gualerzi, D. Hillyard & N. P. Higgins** (1991): Mutations altering chromosomal protein H-NS induce mini-Mu transposition. *New Biol.* **3**: 615-25.
- Falconi, M., N. P. Higgins, R. Spurio, C. L. Pon & C. O. Gualerzi** (1993): Expression of the gene encoding the major bacterial nucleotide protein H-NS is subject to transcriptional auto-repression. *Mol. Microbiol.* **10**: 273-82.
- Falconi, M., A. Brandi, A. La Teana, C. O. Gualerzi & C. L. Pon** (1996): Antagonistic involvement of FIS and H-NS proteins in the transcriptional control of *hns* expression. *Mol. Microbiol.* **19**: 965-75.
- Falconi, M., B. Colonna, G. Prosseda, G. Micheli & C. O. Gualerzi** (1998): Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J.* **17**: 7033-7043.
- Fedorova, N. D., M. Y. Peredelchuk, M. P. Kirpichnikov & G. N. Bennett** (1996): *Escherichia coli* strain for thermoinducible T7 RNA polymerase-driven expression. *Gene* **177**: 267-268.
- Filutowicz, M. & R. Inman** (1991): A compact nucleoprotein structure is produced by binding of *Escherichia coli* integration host factor (IHF) to the replication origin of plasmid R6K. *J. Biol. Chem.* **266**: 24077-24083.
- Filutowicz, M., W. Ross & R. L. Gourse** (1992): Involvement of Fis protein in replication of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **174**: 398-407.
- Finkel, S. E. & R. C. Johnson** (1992): The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore [published erratum appears in *Mol Microbiol* 1993 Mar;7(2):1023]. *Mol. Microbiol.* **6**: 3257-65.
- Flashner, Y. & J. D. Gralla** (1988): DNA dynamic flexibility and protein recognition: differential stimulation by bacterial histone-like protein HU. *Cell* **54**: 713-721.
- Fleig, U. N., K. L. Gould & P. Nurse** (1992): A dominant negative allele of p34cdc2 shows altered phosphoamino acid content and sequesters p56cdc13 cyclin. *Mol. Cell Biol.* **12**: 2295-301.
- Fletcher, S. A. & L. N. Csonka** (1995): Fine-structure deletion analysis of the transcriptional silencer of the *proU* operon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **177**: 4508-4513.
- Forsman, K., B. Sonden, M. Goransson & B. E. Uhlin** (1992): Antirepression function in *Escherichia coli* for the cAMP-cAMP receptor protein transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9880-4.
- Foster, T. J., V. Lundblad, S. Hanley-Way, S. M. Halling & N. Kleckner** (1981): Three *Tn10*-associated excision events: relationship to transposition and role of direct and inverted repeats. *Cell* **23**: 215-227.
- Fraser, C. M., J. D. Gocayne, O. White, M. D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, A. R. Kerlavage, G. Sutton, J. M. Kelley & et al.** (1995): The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**: 397-403.
- Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. Gocayne, J. C. Venter & et al.** (1997): Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**: 580-6.
- Free, A. & C. J. Dorman** (1995): Coupling of *Escherichia coli hns* mRNA levels to DNA synthesis by autoregulation: implications for growth phase control. *Mol. Microbiol.* **18**: 101-13.
- Free, A. & C. J. Dorman** (1997): The *Escherichia coli stpA* gene is transiently expressed during growth in rich medium and is induced in minimal medium and by stress conditions. *J. Bacteriol.* **179**: 909-18.
- Freundlich, M., N. Ramani, E. Mathew, A. Sirko & P. Tsui** (1992): The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**: 2557-2563.
- Fried, M. & D. M. Crothers** (1981): Equilibria and kinetics of *lac* repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **9**: 6506-6525.
- Friedman, D. I.** (1988): Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell* **55**: 545-554.
- Friedrich, K., C. O. Gualerzi, M. Lammi, M. A. Losso & C. L. Pon** (1988): Proteins from the prokaryotic nucleoid. Interaction of nucleic acids with the 15 kDa *Escherichia coli* histone-like protein H-NS. *FEBS Lett.* **229**: 197-202.

- Gazeau, M., F. Delort, M. Fromant, P. Dessen, S. Blanquet & P. Plateau (1994): Structure-function relationship of the *lrp*-binding region upstream of *lysU* in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **241**: 378-389.
- Gebert, J. F., B. Overhoff, M. D. Manson & W. Boos (1988): The Tsr chemosensory transducer of *Escherichia coli* assembles into the cytoplasmic membrane via a SecA-dependent process. *J. Biol. Chem.* **263**: 16652-16660.
- Gellert, M. (1981): DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **50**: 879-910.
- George, J. W., R. M. Brosh & S. W. Matson (1994): A dominant negative allele of the *Escherichia coli* *uvrD* gene encoding DNA helicase II. A biochemical and genetic characterization. *J. Mol. Biol.* **235**: 424-435.
- Gérard, F., A.-M. Dri & P. L. Moreau (1999): Role of *Escherichia coli* RpoS, LexA and H-NS global regulators in metabolism and survival under aerobic, phosphate-starvation conditions. *Microbiol.* **145**: 1547-1562.
- Gille, H., J. B. Egan, A. Roth & W. Messer (1991): The Fis protein binds and bends the origin of chromosomal DNA replication, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* **19**: 4167-4172.
- Gilson, E., J. M. Clement, D. Brutlag & M. Hofnung (1984): A family of dispersed repetitive palindromic DNA sequences in *E. coli*. *EMBO J.* **3**: 1417-1421.
- Gonzalez-Gil, G., P. Bringmann & R. Kahmann (1996): FIS is a regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **22**: 21-9.
- Goosen, N. & P. van de Putte (1995): The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol. Microbiol.* **16**: 1-7.
- Goshima, N., Y. Inagaki, H. Otaki, H. Tanaka, N. Hayashi, F. Imamoto & Y. Kano (1992): Chimeric HU-IHF proteins that alter DNA-binding ability. *Gene* **118**: 97-102.
- Goshima, N., Y. Kano, H. Tanaka, K. Kohno, T. Iwaki & F. Imamoto (1994): IHF supresses the inhibitory effect of H-NS on HU function in the *hin* inversion system. *Gene* **141**: 17-23.
- Gosink, K. K., W. Ross, S. Leirmo, R. Osuna, S. E. Finkel, R. C. Johnson & R. L. Gourse (1993): DNA binding and bending are necessary but not sufficient for Fis-dependent activation of *rrnB* P1. *J. Bacteriol.* **175**: 1580-1589.
- Gottesman, S. (1995): Regulation of capsule synthesis of the two-component paradigm by an accessory unstable regulator. In *Two-Component Signal Transduction*, pp. 253-262, J. A. Hoch and T. J. Silhavy, eds., Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C.
- Gouesbet, G., A. Trautwetter, S. Bonnassie, L. F. Wu & C. Blanco (1996): Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* osmoprotectant transporter gene *ousA*. *J. Bacteriol.* **178**: 447-55.
- Gowrishankar, J. (1989): Nucleotide sequence of the osmoregulatory *proU* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 1923-1931.
- Gowrishankar, J. & D. Manna (1996): How is osmotic regulation of transcription of the *Escherichia coli proU* operon achieved? A review and a model. *Genetica* **97**: 363-78.
- Goyard, S. & P. Bertin (1997): Characterization of BpH3, an H-NS-like protein in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* **24**: 815-23.
- Göransson, M., B. Sonden, P. Nilsson, B. Dagberg, K. Forsman, K. Emanuelsson & B. E. Uhlin (1990): Transcriptional silencing and thermoregulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Nature* **344**: 682-685.
- Graeme-Cook, K. A., G. May, E. Bremer & C. F. Higgins (1989): Osmotic regulation of porin expression: A role for DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **3**: 1287-1294.
- Grant, R. A., D. J. Filman, S. E. Finkel, R. Kolter & J. M. Hogle (1998): The crystal structure of Dps , a ferritin homolog that binds and protect DNA. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 294-303.
- Green, J., M. F. Anjum & J. R. Guest (1997): Regulation of the *ndh* gene of *Escherichia coli* by integration host factor and a novel regulator, *Arr*. *Microbiology* **143**: 2865-75.
- Gualerzi, C. O., M. A. Losso, M. Lammi, K. Friedrich, R. T. Pawlik, M. A. Canonaco, G. Gianfranceschi, A. Pingoud & C. L. Pon (1986): Proteins from the prokaryotic nucleoid: structural and functional characterization of the *Escherichia coli* DNA-binding proteins NS (HU) and H-NS. In *Bacterial chromatin*, pp. 101-134, C. O. Gualerzi and C. L. Pon, eds., Springer-Verlag, Berlin,

- Gutierrez, C. & J. C. Devedjian** (1991): Osmotic induction of gene *osmC* expression in *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* **220**: 959-973.
- Gutierrez, C., S. Gordia & S. Bonnassie** (1995): Characterization of the osmotically inducible gene *osmE* of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **16**: 553-563.
- Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson & J. Beckwith** (1995): Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**: 4121-30.
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 577.
- Harrison, S. C.** (1991): A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* **353**: 715-719.
- Harrison, J. A., D. Pickard, C. F. Higgins, A. Khan, S. N. Chatfield, T. Ali, C. J. Dorman, C. E. Hormaeche & G. Dougan** (1994): Role of *hns* in the virulence phenotype of pathogenic *Salmonellae*. *Mol. Microbiol.* **13**: 133-140.
- Haughland, R.** (1995): Monoclonal antibody protocols. *In Methods in Molecular Biology*, pp. 205-220, W. C. Davis, ed. Humana Press, Totowa N.J.
- Hayat, M. A. & D. A. Mancarella** (1995): Nucleoid proteins. *Micron.* **26**: 461-480.
- Haykinson, M. J. & R. C. Johnson** (1993): DNA looping and the helical repeat *in vitro* and *in vivo* effect of HU protein and enhancer location on Hin invertasome assembly. *EMBO J.* **12**: 2503-2512.
- Hendrickson, W. & R. F. Schleif** (1984): Regulation of the *Escherichia coli* l-arabinose operon studied by gel electrophoresis DNA binding assay. *J. Mol. Biol.* **178**: 611-628.
- Hengge-Aronis, R. & D. Fischer** (1992): Identification and molecular analysis of *glgS*, a novel growth phase-regulated and *rpoS* dependent gene involved in glycogen synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**: 1877-1886.
- Hengge-Aronis, R.** (1996): Regulation of gene expression during entry into stationary phase. *In Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger, eds., ASM Press, Washington, D.C.
- Hengge-Aronis, R.** (1996): Back to log phase: σ^S as a globular regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**: 887-893.
- Hengge-Aronis, R.** (1999): Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 148-52.
- Higgins, C. F., C. J. Dorman & N. NiBhriain** (1990): Environmental influences on DNA supercoiling: a novel mechanism for the regulation of gene expression. *In Bacterial chromosome*, pp. 421-432, K. Drlica and M. Riley, eds., Am. Soc. Microbiol. Press, Washington. D.C.
- Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkel, B. C. Li & R. Herrmann** (1996): Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4420-49.
- Hinton, J. C., D. S. Santos, A. Seirafi, C. S. Hulton, G. D. Pavitt & C. F. Higgins** (1992): Expression and mutational analysis of the nucleoid-associated protein H- NS of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **6**: 2327-37.
- Hromockyj, A. E., S. C. Tucker & A. T. Maurelli** (1992): Temperature regulation of Shigella virulence: identification of the repressor gene *virR*, an analogue of *hns*, and partial complementation by tyrosyl transfer RNA (tRNA^{Tyr}). *Mol. Microbiol.* **6**: 2113-24.
- Hsieh, L.-S., J. Rouvière-Yaniv & K. Drlica** (1991): Bacterial DNA supercoiling and (ATP)/(ADP) ratio: changes associated with salt shock. *J. Bacteriol.* **173**: 3914-3917.
- Huang, L., P. Tsui & M. Freundlich** (1990): Integration host factor is a negative effector of *in vivo* and *in vitro* expression of *ompC* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 5293-5298.
- Huisman, O., M. Faalen, D. Girard, T. Jaffé, A. & J. Rouvière-Yaniv** (1989): Multiple defects in *Escherichia coli* mutants lacking HU protein. *J. Bacteriol.* **171**: 3704-3712.
- Huisman, T. T., D. Bakker, P. Klaasen & F. K. Degraaf** (1994): Leucine-responsive regulatory protein, IS1 insertions, and the negative regulator *faeA* control the expression of the *fae* (k88) operon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **11**: 525-536.

- Hulton, C. S., A. Seirafi, J. C. Hinton, J. M. Sidebotham, L. Waddell, G. D. Pavitt, T. Owen-Hughes, A. Spassky, H. Buc & C. F. Higgins** (1990): Histone-like protein H1 (H-NS), DNA supercoiling, and gene expression in bacteria. *Cell* **63**: 631-42.
- Hübner, P. & W. Arber** (1989): Mutational analysis of a prokaryotic recombinational enhancer element with two functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **8**: 577-585.
- Imamura, R., H. Niki, N. Kitaoka, K. Yamanaka, T. Ogura & S. Hiraga** (1992): Characterization of high molecular weights of complexes and polymers of cytoplasmic protein in *E. coli*. *Res. Microbiol.* **143**: 743-753.
- Ince, B. A., Y. Zhuang, C. K. Wrenn, D. J. Shapiro & B. S. Katzenellenbogen** (1993): Powerful dominant negative mutants of the human estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* **268**: 14026-14032.
- Ishihama, A.** (1997): Adaptation of gene expression in stationary phase bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**: 582-588.
- Ito, K., T. Oshima, T. Mizuno & Y. Nakamura** (1994): Regulation of lysyl-tRNA synthetase expression by histone-like protein H-NS of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 7383-7386.
- Iuchi, S. & E. C. C. Lin** (1987): The *narL* gene product activates the nitrate reductase operon and represses the funarate reductase and the trimethylamine N-oxide reductase operons in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 3901-3905.
- Jacquet, M., R. Cukier-Kahn, J. Pla & F. Gros** (1971): A thermostable protein factor acting on *in vitro* DNA transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**: 1597-1607.
- Jenkins, D. E., E. A. Auger & A. Matin** (1991): Role of RpoH, a heat shock regulator protein, in *Escherichia coli* carbon starvation protein synthesis and survival. *J. Bacteriol.* **173**: 1992-6.
- Johansson, J., B. Dagberg, E. Richet & B. E. Uhlin** (1998): H-NS and StpA proteins stimulate expression of the maltose regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 6117-25.
- Johnson, R. C. & M. I. Simon** (1985): Hin-mediated site specific recombination requires two 26 bp recombination sites and a 60 bp recombinational enhancer. *Cell* **41**: 781-791.
- Jones, H. M. & R. P. Gunzalus** (1987): Regulation of *Escherichia coli* fumarate reductase genes (*frdABCD*) operon expression by respiratory electron acceptors and the *fnr* gene product. *J. Bacteriol.* **169**: 3340-3349.
- Jordi, B. J., B. A. van der Zeijst & W. Gaastra** (1994): Regions of the CFA/I promoter involved in the activation by the transcriptional activator CfaD and repression by the histone-like protein H-NS. *Biochimie* **76**: 1052-1054.
- Jordi, B. J., A. E. Fielder, C. M. Burns, J. C. Hinton, N. Dover, D. W. Ussery & C. F. Higgins** (1997): DNA binding is not sufficient for H-NS-mediated repression of *proU* expression. *J. Biol. Chem.* **272**: 12083-90.
- Jungblut, P. R., U. E. Schaible, H. J. Mollenkopf, U. Zimny-Arndt, B. Raupach, J. Mattow, P. Halada, S. Lamer, K. Hagens & S. H. Kaufmann** (1999): Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol* **33**: 1103-17.
- Kahmann, R., F. Rudt, C. Koch & G. Mertens** (1985): G inversion in bacteriophage Mu DNA is stimulated by a site within the invertase gene and a host factor. *Cell* **41**: 771-780.
- Kaidow, A., M. Wachi, J. Nakamura, J. Magae & K. Nagai** (1995): Anucleate cell production by *Escherichia coli* Δhns mutant lacking a histone-like protein, H-NS. *J. Bacteriol.* **177**: 3589-3592.
- Kajitani, M., A. Kato, A. Wada, Y. Inokuchi & A. Ishihama** (1994): Regulation of the *Escherichia coli* *hfq* gene encoding the host factor for phage Q beta. *J. Bacteriol.* **176**: 531-534.
- Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura & e. al.** (1996): Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**: 109-136.
- Kano, Y., S. Yoshino, M. Wada, K. Ykoyama, M. Nobuhara & F. Imamoto** (1985): Molecular cloning and nucleotide sequence of the *HU-1* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **201**: 360-362.
- Kano, Y., K. Osata, M. Wada & F. Imamoto** (1987): Cloning and sequencing of the *HU-2* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 408-410.

- Kano, Y., K. Yasuzawa, H. Tanaka & F. Imamoto** (1993): Propagation of phage Mu in IHF-deficient *Escherichia coli* in the absence of the H-NS histone-like protein. *Gene* **126**: 93-7.
- Kaplan, J. B.** (1994): Biological activity of human N-ras and K-ras genes containing the Asn17 dominant negative mutation. *Oncol. Res.* **6**: 611-5.
- Karem, K. & J. W. Foster** (1993): The influence of DNA topology on the environmental regulation of a pH-regulated locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **10**: 75-86.
- Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann & D. Ladant** (1998): A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5752-6.
- Kataoka, T., S. Gayama, K. Takahashi, M. Wachi, M. Yamasaki & K. Nagai** (1991): Only *oriC* and its flanking region are recovered from the complex formed at the time of initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **142**: 155-159.
- Katayama, T., M. Takata & K. Sekimizu** (1996): The nucleoid protein H-NS facilitates chromosome DNA replication in *Escherichia coli dnaA* mutants. *J. Bacteriol.* **178**: 5790-2.
- Kawula, T. H. & P. E. Orndorff** (1991): Rapid site-specific DNA inversion in *Escherichia coli* mutants lacking the histonelike protein H-NS. *J. Bacteriol.* **173**: 4116-23.
- Kawula, T. H. & M. J. Lelivelt** (1994): Mutations in a gene encoding a new Hsp70 suppress rapid DNA inversion and *bgl* activation, but not *proU* derepression, in *hns-1* mutant *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 610-619.
- Kellenberger, E.** (1990): Intracellular organization of the bacterial genome. *In* Bacterial chromatin, pp. 173-186, K. Drlica and M. Riley, eds., ASM Press, Washington, D. C.
- Kellenberger, E.** (1991): Functional consequences of improved structural information on bacterial nucleoids. *Res. Microbiol.* **142**: 229-238.
- Kleckner, N. & S. Gottesman** (1991): Uses of transposons with emphasis on *Tn10*. *Meth. Enzymol.* **204**: 139-180.
- Kleckner, N., R. M. Chalmers, D. Kwon, J. Sakai & S. Bolland** (1996): *Tn10* and *IS10* transposition and chromosome rearrangements: mechanism and regulation *in vivo* and *in vitro*. *Curr.Top.Microbiol. Immunol.* **204**: 49-82.
- Kleppe, K. & A. Holck** (1985): Affinity of protein HU for different nucleic acids. *FEBS Lett.* **185**: 121-124.
- Klose, J.** (1975): Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**: 231-243.
- Klose, K. E., A. K. North, K. M. Stedman & S. Kustu** (1994): The major dimerization determinants of the nitrogen regulatory protein ntrc from enteric bacteria lie in its carboxy-terminal domain. *J. Mol. Biol.* **241**: 233-245.
- Kobryn, K., B. D. Lavoie & G. Chaconas** (1999): Supercoiling-dependent site-specific binding of HU to naked Mu DNA. *J Mol Biol* **289**: 777-84.
- Koch, C. O., O. Ninnemann, H. Fuss & R. Kahmann** (1991): The N-terminal part of the *E. coli* DNA-binding protein Fis is essential for stimulating site-specific DNA inversion but is not required for specific DNA binding. *Nucleic Acids Res.* **19**: 5915-5922.
- Koo, H.-S., H.-M. Wu & D. M. Crothers** (1986): DNA bending at adenine-thymine tracts. *Nature* **305**: 248-250.
- Kornberg, R. & A. Klug** (1981): The nucleosome. *Sci. Am.* 48-59.
- Kornberg, R. D. & Y. Lorch** (1992): Chromatin structure and transcription. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **8**: 563-587.
- Kostrewa, D., J. Granzin, C. Koch, H.-W. Choe, S. Raghunathan, W. Wolf, J. Labahn, K. Kahmann & W. Saenger** (1991): Three-dimensional structure of the *E. coli* DNA-binding protein Fis. *Nature* **349**: 178-180.
- Kostrewa, D., J. Granzin, H.-W. Choe, J. Labahn & W. Saenger** (1992): Crystal structure of the factor for inversion stimulation Fis at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **226**: 209-226.
- Krawczyk, B. & J. Kur** (1998): *In vitro* interaction of the IHF-like proteins *Acinetobacter junii* and *Proteus vulgaris* with *ihf* sites. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**: 187-92.

- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, A. V. & e. al. (1997): The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.
- La Teana, A., M. Falconi, V. Scarlato, M. Lammi & C. L. Pon (1989): Characterization of the structural genes for the DNA-binding protein H- NS in *Enterobacteriaceae*. *FEBS Lett.* **244**: 34-8.
- La Teana, A., A. Brandi, M. Falconi, R. Spurio, C. L. Pon & C. O. Gualerzi (1991): Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10907-11.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laine, B., P. Sautiere, A. Spassky & S. Rimsky (1984): A DNA-binding protein from *E. coli* isolation, characterization and its relationship with proteins H1 and B1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**: 1147-1153.
- Landgraf, J. R., M. Levinthal & A. Danchin (1994): The role of H-NS in one carbon metabolism. *Biochimie* **76**: 1063-1070.
- Lange, R. & R. Hengge-Aronis (1991): Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 49-59.
- Lange, R. & R. Hengge-Aronis (1991): Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary phase *Escherichia coli* cells is controlled by the novel sigma factor σ^S (*rpoS*). *J. Bacteriol.* **173**: 4474-4481.
- Langer, U., S. Richter, A. Roth, C. Weigel & W. Messer (1996): A comprehensive set of DnaA-box mutations in the replication origin, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**: 301-11.
- Laurent-Winter, C., P. Lejeune & A. Danchin (1995): The *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS is one of the first proteins to be synthesized after a nutritional upshift. *Res. Microbiol.* **146**: 5-16.
- Laurent-Winter, C., S. Ngo, A. Danchin & P. Bertin (1997): Role of *Escherichia coli* histone-like nucleoid-structuring protein in bacterial metabolism and stress response- identification of targets by two-dimensional electrophoresis. *Eur. J. Biochem.* **244**: 767-73.
- Lazazzera, B. A., D. M. Bates & P. J. Kiley (1993): The activity of the *Escherichia coli* transcription factor FNR is regulated by a change in oligomeric state. *Genes Dev.* **7**: 1993-2005.
- Lazazzera, B. A., H. Beinert, N. Khoroshilova, M. C. Kennedy & P. J. Kiley (1996): DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J. Biol. Chem.* **271**: 2762-8.
- Le Hegarat, F., V. Salti-Montesanto, Y. Hauck & L. Hirschbein (1993): Purification and characterization of the HU-like protein HPB9 from the *Bacillus subtilis* nucleoid. *Biochim. Biophys. Acta* **1172**: 101-7.
- Lease, R. A., M. E. Cusick & M. Belfort (1998): Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12456-61.
- Lejeune, P., P. Bertin, C. Walon, K. Willemot, C. Colson & A. Danchin (1989): A locus involved in kanamycin, chloramphenicol and L-serine resistance is located in the *bglY-galU* region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 361-3.
- Lejeune, P. & A. Danchin (1990): Mutations in the *bglY* gene increase the frequency of spontaneous deletions in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 360-363.
- Levinthal, M., P. Lejeune & A. Danchin (1994): The H-NS protein modulates the activation of the *ilvIH* operon of *Escherichia coli* K-12 by Lrp, the Leucine Regulatory Protein. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 736-743.
- Levy, M. S., P. Pomposiello & R. Nagel (1991): RecA-dependent increased precise excision of Tn10 in *Salmonella typhimurium*. *Mutat.Res.* **255**: 95-100.
- Lewis, D. E., M. Geanacopoulos & S. Adhya (1999): Role of HU and DNA supercoiling in transcription repression: specialized nucleoprotein repression complex at *gal* promoters in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **31**: 451-61.
- Lin, R., R. D'Ari & E. B. Newman (1990): The leucin regulon of *Escherichia coli*: a mutation in *rblA* alters expression of leucin-dependent metabolic operons. *J. Bacteriol.* **172**: 4529-4535.

- Link, A. J., D. Phillips & G. M. Church** (1997): Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* **179**: 6228-37.
- Little, J. W. & D. W. Mount** (1982): The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* **29**: 11-22.
- Liu, L. F. & J. C. Wang** (1987): Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7024-7027.
- Liu, Q. & C. Richardson** (1993): Gene 5.5 protein of bacteriophage T7 inhibits the nucleoid protein H-NS of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1761-1765.
- Lobell, R. B. & R. F. Schleif** (1990): DNA looping and unlooping by AraC protein. *Science* **250**: 528-532.
- Lucht, J. M., P. Dersch, B. Kempf & E. Bremer** (1994): Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*
- Lucht, J. M. & E. Bremer** (1994): Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: Osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiology Reviews* **14**: 3-20.
- Majdalani, N., C. Cuning, D. Sledjeski, T. Elliott & S. Gottesman** (1998): DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12462-7.
- Malik, M., A. Bensaid, J. Rouviere-Yaniv & K. Drlica** (1996): Histone-like protein HU and bacterial DNA topology: suppression of an HU deficiency by gyrase mutations. *J. Mol. Biol.* **256**: 66-76.
- Marasco, R., M. Varcamonti, F. Lacara, E. Ricca, M. Defelice & M. Sacco** (1994): *In vivo* footprinting analysis of Lrp binding to the *ilvH* promoter region of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 5197-5201.
- Marsh, M. & D. R. Hillyard** (1990): Nucleotide sequence of *hns* encoding the DNA-binding protein H-NS of *Salmonella typhimurium*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3397.
- Martinez, A. & R. Kolter** (1997): Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA binding protein Dps. *J. Bacteriol.* **179**: 5188-5194.
- Marykwas, D. L., S. A. Schmidt & H. C. Berg** (1996): Interacting components of the flagellar motor of *Escherichia coli* revealed by the two-hybrid system in yeast. *J. Mol. Biol.* **256**: 564-76.
- May, G., E. Faatz, M. Villarejo & E. Bremer** (1986): Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **205**: 225-233.
- May, G., P. Dersch, M. Haardt, A. Middendorf & E. Bremer** (1990): The *osmZ* (*bglY*) gene encodes the DNA-binding protein H-NS (H1a), a component of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 81-90.
- McClellan, J. A., P. Boublikova, E. Palecek & D. M. J. Lilley** (1990): Superhelical tension in cellular DNA responds directly to environmental and genetic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8373-8377.
- McGovern, V., N. P. Higgins, R. S. Chiz & A. Jaworski** (1994): H-NS over-expression induces an artificial stationary phase by silencing global transcription. *Biochimie* **76**: 1019-29.
- McInerney, E. M., B. A. Ince, D. J. Shapiro & B. S. Katzenellenbogen** (1996): A transcriptionally active estrogen receptor mutant is a novel type of dominant negative inhibitor of estrogen action. *Mol. Endocrinol.* **10**: 1519-26.
- Miller, O. L., B. A. Hamkolo & C. A. Thomas** (1970): Visualization of bacterial genes in action. *Science* **169**: 68-73.
- Miller, J. H.** (1992). A short course in bacterial genetic: A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria, C. S. H. Laboratories, Cold Spring Harbor, New York,
- Mirkovitch, J., S. M. Gasser & K. Laemmli** (1988): Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes. *J. Mol. Biol.* **200**: 4612-4617.
- Mollenkopf, H. J., P. R. Jungblut, B. Raupach, J. Mattow, S. Lamer, U. Zimny-Arndt, U. E. Schaible & S. H. Kaufmann** (1999): A dynamic two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database: the mycobacterial proteome via Internet. *Electrophoresis* **20**: 2172-80.

- Moreno, F., J. L. San Millán, I. del Castillo, J. M. Gómez & S. M. C. Rodríguez** (1992): *Escherichia coli* genes regulating the production of microcins MccB17 and MccC7. In *Bacteriocins, Microcins, and Lantibiotics*, pp. 3-14, R. James, C. Lazdunski and F. Pattus, eds., Springer-Verlag, Heidelberg.
- Morisato, D. & N. Kleckner** (1987): Tn10 transposition and circle formation *in vitro*. *Cell* **51**: 101-111.
- Morschhauser, J., B. E. Uhlin & J. Hacker** (1993): Transcriptional analysis and regulation of the *sfa* determinant coding for S fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains. *Mol. Gen. Genet.* **238**: 97-105.
- Muffler, A., D. Fischer & R. Hengge-Aronis** (1996): The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Q_β RNA replication, is essential for *rpoS* translation in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **10**: 1143-1151.
- Muhldorfer, I., J. Hacker, G. T. Keusch, D. W. Acheson, H. Tschape, A. V. Kane, A. Ritter, T. Olschlager & A. Donohue-Rolfe** (1996): Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **64**: 495-502.
- Mulvey, M. R. & P. C. Loewen** (1989): Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggest KatF protein is a novel σ transcription factor. *Nucl. Acids Res.* **17**: 9979-9991.
- Muramatsu, S., M. Kato, Y. Kohara & T. Mizuno** (1988): Insertion sequence IS5 contains a sharply curved DNA structure at its terminus. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 433-438.
- Murphy, L. D. & S. B. Zimmerman** (1994): Macromolecular crowding effects on the interaction of DNA with *Escherichia coli* DNA-binding proteins - a model for bacterial nucleoid stabilization. *Biochim. Biophys. Acta* **1219**: 277-284.
- Murphy, L. D. & S. B. Zimmerman** (1997): Stabilization of compact spermidine nucleoids from *Escherichia coli* under crowded conditions: implications for *in vivo* nucleoid structure. *J. Struct. Biol.* **119**: 336-46.
- Muskhelishvili, G., A. A. Travers, H. Heumann & R. Kahmann** (1995): FIS and RNA polymerase holoenzyme form a specific nucleoprotein complex at a stable RNA promoter. *EMBO J.* **14**: 1446-52.
- Newman, E. B., R. D'Ari & R. T. Lin** (1992): The leucine-Lrp regulon in *E. coli*: a global response in search of a raison d'être. *Cell* **68**: 617-619.
- Newman, E. B. & R. Lin** (1995): Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 747-75.
- Nicholson, B. & D. Low** (2000): DNA methylation-dependent regulation of *pef* expression in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **35**: 728-42.
- Nieto, J. M. & A. Juarez** (1999): The putative Orf4 of broad-host-range conjugative plasmid R446 could be related to the H-NS family of bacterial nucleoid-associated proteins. *Plasmid* **41**: 125-7.
- Nilsson, L., E. Vijgenboom, C. van Drunen, A. Vanet & L. Bosch** (1992): Fis-dependent *trans* activation of stable RNA operons of *Escherichia coli* under various growth conditions. *J. Bacteriol.* **174**: 921-929.
- Ninnemann, O., C. Koch & R. Kahmann** (1992): The *E. coli* promoter is subject to stringent control and autoregulation. *EMBO J.* **11**: 1075-1083.
- Nou, X., B. Skinner, B. Braaten, L. Blyn, D. Hirsch & D. Low** (1993): Regulation of pyelonephritis-associated pili phase-variation in *Escherichia coli*: binding of the PapI and the Lrp regulatory proteins is controlled by DNA methylation. *Mol. Microbiol.* **7**: 545-553.
- Nystrom, T. & F. C. Neidhardt** (1992): Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**: 3187-98.
- O'Byrne, C. P. & C. J. Dorman** (1994): Transcription of the *Salmonella typhimurium* *spv* virulence locus is regulated negatively by the nucleoid-associated protein H-NS. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**: 99-105.
- O'Gara, J. P. & C. J. Dorman** (2000): Effects of local transcription and H-NS on inversion of the *fim* switch of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **36**: 457-66.
- Odgen, G. & M. Schaechter** (1986): The association of the chromosome with the cell membrane. In *Bacterial chromatin*, pp. 45-49, C. O. Gualerzi and C. L. Pon, eds., Springer-Verlag, Berlin.
- Odgen, G., M. J. Pratt & M. Schaechter** (1988): The replicative origin of the *E. coli* chromosome binds to cell membranes only when hemimethylated. *Cell* **54**: 127-135.

- Ohta, T., C. Ueguchi & T. Mizuno** (1999): *rpoS* function is essential for *bgl* silencing caused by C-terminally truncated H-NS in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **181**: 6278-6283.
- Olsen, A., A. Arnqvist, M. Hammar, S. Sukupolvi & S. Normark** (1993): The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **7**: 523-36.
- Oppenheim, A. B., K. E. Rudd, I. Mendelson & D. Teff** (1993): Integration host factor binds to a unique class of complex repetitive extragenic DNA sequences in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **10**: 113-122.
- Oshima, T., K. Ito, H. Kabayama & Y. Nakamura** (1995): Regulation of *lrp* gene expression by H-NS and Lrp proteins in *Escherichia coli* - Dominant negative mutations in Lrp. Mol. Gen. Genet. **247**: 521-528.
- Osuna, R., S. E. Finkel & R. C. Johnson** (1991): Identification of two functional regions in Fis: the N-terminus is required to promote Hin-mediated DNA inversion but not λ excision. EMBO J. **10**: 1593-1603.
- Owen-Hughes, T. A., G. D. Pavitt, D. S. Santos, J. M. Sidebotham, C. S. Hulton, J. C. Hinton & C. F. Higgins** (1992): The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. Cell **71**: 255-65.
- O'Brien, G. J. & H. K. Mahanty** (1994): Colicin 24, a new plasmid-borne colicin from a uropathogenic strain of *Escherichia coli*. Plasmid **31**: 288-296.
- O'Farrell, P. H.** (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. **250**: 4007-4021.
- Pagel, J. M. & G. W. Hatfield** (1991): Integration host factor-mediated expression of the *ilvGMEDA* operon of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **266**: 1985-1996.
- Palchaudhuri, S., B. Tominna & M. A. Leon** (1998): H-NS regulates DNA repair in *Shigella*. J. Bacteriol. **180**: 5260-2.
- Paull, T. T., M. J. Haykinson & R. C. Johnson** (1994): HU and functional analogs in eukaryotes promote Hin invertasome assembly. Biochimie **76**: 992-997.
- Pedersen, L. B., S. Birkelund & G. Christiansen** (1994): Interaction of the *Chlamydia trachomatis* histone H1-like protein (Hc1) with DNA and RNA causes repression of transcription and translation *in vitro*. Mol. Microbiol. **11**: 1085-1098.
- Perez-Martin, J. & V. De Lorenzo** (1997): Coactivation *in vitro* of the sigma54-dependent promoter Pu of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* by HU and the mammalian HMG-1 protein. J. Bacteriol. **179**: 2757-60.
- Perraud, A.-L.** (1994): Charakterisierung des chromosomengebundenen H-NS Proteins aus *Escherichia coli*. .
- Pettijohn, D. E. & O. Pfenninger** (1980): Supercoils in prokaryotic DNA restrained *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**: 1331-1335.
- Pettijohn, D. E.** (1996): The nucleoid. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, pp. 158-166, F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger, eds., ASM Press, Washington, D.C.
- Platko, J. V. & J. M. Calvo** (1993): Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or response to leucine. J. Bacteriol. **175**: 1110-1117.
- Pollock, T. J. & H. A. Nash** (1983): Knotting of DNA caused by a genetic rearrangement. Evidence for a nucleosome-like structure in site-specific recombination of bacteriophage lambda. J. Mol. Biol. **170**: 1-18.
- Pon, C. L., R. A. Calogero & C. O. Gualerzi** (1988): Identification, cloning, nucleotide sequence and chromosomal map location of *hns*, the structural gene for *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS. Mol. Gen. Genet. **212**: 199-202.
- Pontiggia, A., A. Negri, A. Beltrame & M. E. Bianchi** (1993): Protein HU binds to specially kinked DNA. Mol. Microbiol. **7**: 343-350.
- Porter, M. E. & C. J. Dorman** (1994): A role for H-NS in the thermo-osmotic regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. J. Bacteriol. **176**: 4187-4191.

- Porter, M. E. & C. J. Dorman** (1997): Differential regulation of the plasmid-encoded genes in the *Shigella flexneri* virulence regulon. *Mol. Gen. Genet.* **256**: 93-103.
- Prager, D., H. L. Li, S. Asa & S. Melmed** (1994): Dominant negative inhibition of tumorigenesis *in vivo* by human insulin-like growth factor I receptor mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2181-5.
- Pratt, T. S., T. Steiner, L. S. Feldman, K. A. Walker & R. Osuna** (1997): Deletion analysis of the *fis* promoter region in *Escherichia coli*: antagonistic effects of integration host factor and Fis. *J. Bacteriol.* **179**: 6367-77.
- Prosseda, G., P. A. Fradiani, M. Di Lorenzo, M. Falconi, G. Micheli, M. Casalino, M. Nicoletti & B. Colonna** (1998): A role for H-NS in the regulation of the *virF* gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **149**: 15-25.
- Raibaud, O.** (1989): Nucleoprotein structures at positively regulated bacterial promoters: homology with replication origins and some hypotheses on the quaternary structure of the activator proteins in these complexes. *Mol. Microbiol.* **3**: 455-8.
- Ramani, N., L. Huang & M. Freundlich** (1992): *In vitro* interactions of integration host factor with the *ompF* promoter-regulatory region of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **231**: 248-255.
- Ramdas, J., E. Mythili & K. Muniyappa** (1989): RecA protein promoted homologous pairing *in vitro*. Pairing between linear duplex DNA bound to HU Protein (nucleosome cores) and nucleoprotein filaments of RecA protein-single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* **264**: 17395-400.
- Ransone, L. J., J. Visvader, P. Wamsley & I. M. Verma** (1990): Trans-dominant negative mutants of *fos* and *jun*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3806-3810.
- Repoila, F. & C. Gutierrez** (1991): Osmotic induction of the periplasmic trehalase in *Escherichia coli* K12: characterization of the *treA* gene promoter. *Mol. Microbiol.* **5**: 747-755.
- Rimsky, S. & A. Spassky** (1990): Sequence determinants for H1 binding on *Escherichia coli lac* and *gal* promoters. *Biochemistry* **29**: 3765-3771.
- Robertson, C. A. & H. A. Nash** (1988): Bending of the bacteriophage λ attachment site by *Escherichia coli* integration host factor. *J. Biol. Chem.* **263**: 3554-3557.
- Robinow, C. F. & E. Kellenberger** (1994): The bacterial nucleoid revisited. *Microbiol. Rev.* **58**: 211-232.
- Ross, W., J. F. Thompson, J. T. Newlands & R. L. Gourse** (1990): *E. coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *in vivo*. *EMBO J.* **9**: 3733-3742.
- Rouviere-Yaniv, J., M. Yaniv & J. E. Germond** (1979): *E. coli* DNA binding protein HU forms nucleosome like structure with circular double-stranded DNA. *Cell* **17**: 265-74.
- Rowbury, R. J. & N. H. Hussain** (1996): Exposure of *Escherichia coli* to acid habituation conditions sensitizes it to alkaline stress. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**: 57-61.
- Rowbury, R. J.** (1997): Regulatory components, including integration host factor, CysB and H- NS, that influence pH responses in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**: 319-28.
- Saarilathi, H. T. & E. T. Palva** (1985): *In vivo* transfer of chromosomal mutations onto multicopy plasmids utilizing *polA* strains: cloning of an *ompR2* mutation in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**: 27-33.
- Sambrook, J., E. Fritsch & T. Maniatis** (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2 rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson** (1977): DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schmid, M. B.** (1990): More than just "histone-like" proteins. *Cell* **63**: 451-453.
- Schmid, M. B. & U. von Freiesleben** (1996): Nucleoid segregation. *In Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. 1662-1671, F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger, eds., ASM Press, Washington, D.C.
- Schnetz, K., C. Tolocyki & B. Rak** (1987): β -glucoside (*bgl*) operon of *E. coli* K-12: nucleotide sequence, genetic organization and possible evolutionary relationship to regulatory components of two *Bacillus subtilis* genes. *J. Bacteriol.* **169**: 2579-2590.

- Schnetz, K. & J. C. Wang** (1996): Silencing of the *Escherichia coli* *bgl* promoter- Effects of template supercoiling and cell extracts on promoter activity *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **24**: 2422-2428.
- Schroder, I., S. Darie & R. P. Gunsalus** (1993): Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (*narGHJ*) operon by NarL and FNR requires integration host factor. *J. Biol. Chem.* **268**: 771-4.
- Shao, X., P. Hensley & C. R. Matthews** (1997): Construction and characterization of monomeric tryptophan repressor: a model for an early intermediate in the folding of a dimeric protein. *Biochemistry* **36**: 9941-9.
- Shellman, V. L. & D. E. Pettijohn** (1991): Introduction of proteins into living bacterial cells: distribution of labeled HU protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 3059-3074.
- Sheppard, C. J. R. & D. M. Shotton** (1997). Confocal laser scanning microscopy, BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Sheridan, S. D., C. J. Benham & G. W. Hatfield** (1998): Activation of gene expression by a novel DNA structural transmission mechanism that requires supercoiling-induced DNA duplex destabilization in an upstream activating sequence. *J. Biol. Chem.* **273**: 21298-308.
- Shi, S., B. C. Waasdorp & G. N. Bennett** (1993): Modulation of acid-induced amino acid decarboxylase gene expression by *hns* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 1182-1186.
- Shi, X. L. & G. N. Bennett** (1994): Plasmids bearing *hfq* and the *hns*-like gene *stpA* complement *hns* mutants in modulating arginine decarboxylase gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 6769-6775.
- Shi, X. L. & G. N. Bennett** (1995): Effects of multicopy *leuO* on the expression of the acid-inducible lysine decarboxylase gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 810-814.
- Shichinohe, T., N. Senmaru, K. Furuuchi, Y. Ogiso, H. Ishikura, T. Yoshiki, T. Takahashi, H. Kato & N. Kuzumaki** (1996): Suppression of pancreatic cancer by the dominant negative *ras* mutant, N116Y. *J. Surg. Res.* **66**: 125-30.
- Shimada, H., T. Wada, H. Handa, H. Ohta, H. Mizoguchi, K. Nishimura, T. Masuda, Y. Shioi & K. Takamiya** (1996): A transcription factor with a leucine-zipper motif involved in light- dependent inhibition of expression of the *puf* operon in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Plant Cell Physiol.* **37**: 515-22.
- Shimamoto, T. & M. Inouye** (1996): Mutational analysis of Era, an essential GTP-binding protein of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**: 57-62.
- Shindo, H., A. Furubayashi, M. Shimizu, M. Miyake & F. Imamoto** (1992): Preferential binding of *E. coli* histone-like protein HU α to negatively supercoiled DNA. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1553-1558.
- Shindo, H., H. Kurumizaka, A. Furubayashi, C. Sakuma, U. Matsumoto, A. Yanagida, N. Goshima, Y. Kano & F. Imamoto** (1993): Proton NMR study on a histone-like protein HU- α , from *E. coli* and its complex with oligo DNAs. *Biol. Pharm. Bull.* **16**: 437-443.
- Shindo, H., T. Iwaki, R. Ieda, H. Kurumizaka, C. Ueguchi, T. Mizuno, S. Morikawa, H. Nakamura & H. Kuboniwa** (1995): Solution structure of the DNA binding domain of a nucleoid-associated protein, H-NS, from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **360**: 125-131.
- Shindo, H., A. Ohnuki, H. Ginba, E. Katoh, C. Ueguchi, T. Mizuno & T. Yamazaki** (1999): Identification of the DNA binding surface of H-NS protein from *Escherichia coli* by heteronuclear NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* **455**: 63-9.
- Signon, L. & N. Kleckner** (1995): Negative and positive regulation of Tn10/IS10-promoted recombination by IHF: two distinguishable processes inhibit transposition off of multicopy plasmid replicons and activate chromosomal events that favor evolution of new transposons. *Genes Dev.* **9**: 1123-36.
- Silhavy, T. J., M. L. Berman & L. W. Enquist** (1984). Experiments with gene fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sirko, A., E. Zehelein, M. Freundlich & G. Sawers** (1993): Integration host factor is required for anaerobic pyruvate induction of *pfl* operon expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 5769-5777.
- Sledjeski, D. & S. Gottesman** (1995): A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced *rcaA* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2003-2007.

- Sledjeski, D. D., A. Gupta & S. Gottesman** (1996): The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*. *EMBO Journal* **15**: 3993-4000.
- Smyth, C. P., T. Lundback, D. Renzoni, G. Siligardi, R. Beavil, M. Layton, J. M. Sidebotham, J. C. Hinton, P. C. Driscoll, C. F. Higgins & J. E. Ladbury** (2000): Oligomerization of the chromatin-structuring protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **36**: 962-72.
- Sonden, B. & B. E. Uhlin** (1996): Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. *EMBO J.* **15**: 4970-80.
- Soutourina, O., A. Kolb, E. Krin, C. Laurent-Winter, S. Rimsky, A. Danchin & P. Bertin** (1999): Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J. Bacteriol.* **181**: 7500-8.
- Spassky, A., S. Rimsky, H. Garreau & H. Buc** (1984): H1a, an *E. coli* DNA-binding protein which accumulates in stationary phase, strongly compacts DNA *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **12**: 5321-5340.
- Spears, P. A., D. Schauer & P. E. Orndorff** (1986): Metastable regulation of type 1 pilation in *E. coli* and isolation and characterization of a phenotypically stable mutant. *J. Bacteriol.* **168**: 179-185.
- Spirito, F., N. Figueroa-Bossi & L. Bossi** (1994): The relative contributions of transcription and translation to plasmid DNA supercoiling in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **11**: 111-122.
- Spurio, R., M. Durrenberger, M. Falconi, A. La Teana, C. L. Pon & C. O. Gualerzi** (1992): Lethal overproduction of the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS: ultramicroscopic and molecular autopsy. *Mol. Gen. Genet.* **231**: 201-11.
- Spurio, R., M. Falconi, A. Brandi, C. L. Pon & C. O. Gualerzi** (1997): The oligomeric structure of nucleoid protein H-NS is necessary for recognition of intrinsically curved DNA and for DNA bending. *EMBO J.* **16**: 1795-805.
- Srivastava, S., S. Wang, Y. A. Tong, Z. M. Hao & E. H. Chang** (1993): Dominant negative effect of a germ-line mutant *p53*: a step fostering tumorigenesis. *Cancer Res.* **53**: 4452-5.
- Stauffer, L. T. & G. V. Stauffer** (1999): Role for the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) as a structural protein in regulating the *Escherichia coli gcvTHP* operon. *Microbiol.* **145**: 569-76.
- Stern, M. J., G. F. L. Ames, N. J. Smith, R. E.C. & C. F. Higgins** (1987): Repetitive extragenic palindromic (REP) sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* **37**: 1015-1026.
- Strøm, A. R. & I. Kaasen** (1993): Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.* **8**: 205-210.
- Studier, F. W. & B. A. Moffatt** (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- Sung, Y. J., M. C. Hwang & Y. W. Hwang** (1996): The dominant negative effects of H-ras harboring a Gly to Ala mutation at position 60. *J. Biol. Chem.* **271**: 30537-43.
- Suzuki, T., C. Ueguchi & T. Mizuno** (1996): H-NS regulates *ompF* expression through *micF* antisense RNA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 3650-3.
- Tabassum, R., K. M. Sandman & J. N. Reeve** (1992): Hmt, a histone-related protein from *Methanobacterium thermoautotrophicum* DH. *J. Bacteriol.* **174**: 7890-7895.
- Tabor, S. & C. C. Richardson** (1985): A bacteriophage T7 RNA polymerase / promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 1074-1078.
- Takeda, Y., D. H. Ohlendorf, W. F. Anderson & B. W. Matthews** (1983): DNA-binding proteins. *Science* **221**: 1020-6.
- Takeshita, S., M. Sato, M. Tabo, W. Masahashi & T. Hashimoto-Gothoh** (1987): High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lacZ* α -complementation and chloramphenicol- or kanamycin resistance selection. *Gene* **61**: 63-74.
- Talukder, A. A., A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda & A. Ishihama** (1999): Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* **181**: 6361-6370.
- Talukder, A. A. & A. Ishihama** (1999): Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and dna binding affinity. *J. Biol. Chem.* **274**: 33105-33113.

- Tanaka, I., K. Appelt, J. Dijk, S. W. White & K. S. Wilson** (1984): 3-Å resolution structure of a protein with histone-like properties in prokaryotes. *Nature* **310**: 376-381.
- Tanaka, K.-I., S. Muramatsu, H. Yamada & T. Mizuno** (1991): Systematic characterization of curved DNA segments randomly cloned from *Escherichia coli* and their functional significance. *Mol. Gen. Genet.* **226**: 367-376.
- Tanaka, H., N. Goshima, K. Kohno, Y. Kano & F. Imamoto** (1993): Properties of DNA binding of HU heterotypic and homotypic dimers from *E. coli*. *J. Biochem.* **113**: 568-572.
- Tchetina, E. & E. B. Newman** (1995): Identification of Lrp-regulated genes by inverse PCR and sequencing: regulation of two mal operons of *Escherichia coli* by leucine-responsive regulatory protein. *J. Bacteriol.* **177**: 2679-83.
- Tendeng, C., C. Badaut, E. Krin, P. Gounon, S. Ngo, A. Danchin, S. Rimsky & P. Bertin** (2000): Isolation and characterization of *vicH*, encoding a new pleiotropic regulator in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **182**: 2026-2032.
- Thompson, J. F., L. M. DeVargas, C. Koch, R. Kahmann & A. Landy** (1987): Cellular factors couple recombination with growth phase: Characterization of a new component in the site-specific recombination pathway. *Cell* **50**: 901-908.
- Thompson, J. F. & A. Landy** (1988): Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles: applications to λ site-specific recombination complexes. *Nucleic Acids Res.* **16**: 9687-9705.
- Tietze, E. & H. Tschape** (1994): Temperature-dependent expression of conjugation pili by IncM plasmid-harboring bacteria: identification of plasmid-encoded regulatory functions. *J. Basic Microbiol.* **34**: 105-16.
- Tippner, D., H. Afflerbach, C. Bradaczek & R. Wagner** (1994): Evidence for a regulatory function of the histone-like *Escherichia coli* protein H-NS in ribosomal RNA synthesis. *Mol. Microbiol.* **11**: 589-604.
- Tippner, D. & R. Wagner** (1995): Fluorescence analysis of the *Escherichia coli* transcription regulator H-NS reveals two distinguishable complexes dependent on binding to specific or nonspecific DNA sites. *J. Biol. Chem.* **270**: 22243-22247.
- Tobe, T., M. Yoshikawa, T. Mizuno & C. Sasakawa** (1993): Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by *virF* and repression by H-NS. *J. Bacteriol.* **175**: 6142-9.
- Tobe, T., M. Yoshikawa & C. Sasakawa** (1994): Dereglulation of temperature-dependent transcription of the invasion regulatory gene, *virB*, in *Shigella* by *rho* mutation. *Mol. Microbiol.* **12**: 267-276.
- Tobe, T., M. Yoshikawa & C. Sasakawa** (1995): Thermoregulation of *virB* transcription in *Shigella flexneri* by sensing of changes in local DNA superhelicity. *J. Bacteriol.* **177**: 1094-7.
- Tomb, J. F., O. White, A. R. Kelavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann & e. al.** (1997): The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**: 539-547.
- Torshin, I.** (1999): Activating oligomerization as intermediate level of signal transduction: analysis of protein-protein contacts and active sites in several glycolytic enzymes. *Front. Biosci.* **4**: D557-70.
- Towbin, H., T. Staehlin & J. Gordon** (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- Travers, A. & G. Muskhelishvili** (1998): DNA microloops and microdomains: a general mechanism for transcription activation by torsional transmission. *J. Mol. Biol.* **279**: 1027-43.
- Treptow, N. A. & H. A. Shuman** (1985): Genetic evidence for substrate and periplasmic-binding-protein recognition by the MalF and MalG proteins, cytoplasmic membrane components of the *Escherichia coli* maltose transport system. *J. Bacteriol.* **163**: 654-660.
- Tupper, A. E., T. A. Owenhughes, D. W. Ussery, D. S. Santos, D. J. P. Ferguson, J. M. Sidebotham, J. C. D. Hinton & C. F. Higgins** (1994): The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology *in vitro*. *EMBO J.* **13**: 258-268.
- Ueguchi, C. & K. Ito** (1992): Multicopy suppression: an approach to understanding intracellular functioning of the protein export system. *J. Bacteriol.* **174**: 1454-1461.
- Ueguchi, C. & T. Mizuno** (1993): The *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS functions directly as a transcriptional repressor. *EMBO J.* **12**: 1039-1046.

- Ueguchi, C., M. Kakeda & T. Mizuno** (1993): Autoregulatory expression of the *Escherichia coli hns* gene encoding a nucleoid protein: H-NS functions as a repressor of its own transcription. *Mol. Gen. Genet.* **236**: 171-8.
- Ueguchi, C., T. Suzuki, T. Yoshida, K. Tanaka & T. Mizuno** (1996): Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J. Mol. Biol.* **263**: 149-62.
- Ueguchi, C., C. Seto, T. Suzuki & T. Mizuno** (1997): Clarification of the dimerization domain and its functional significance for the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J. Mol. Biol.* **274**: 145-51.
- Ussery, D. W., J. C. Hinton, B. J. Jordi, P. E. Granum, A. Seirafi, R. J. Stephen, A. E. Tupper, G. Berridge, J. M. Sidebotham & C. F. Higgins** (1994): The chromatin-associated protein H-NS. *Biochimie* **76**: 968-980.
- van der Woude, M. W., B. A. Braaten & D. A. Low** (1992): Evidence for global regulatory control of pilus expression in *Escherichia coli* by Lrp and DNA methylation: model building based on analysis of *pap*. *Mol. Microbiol.* **6**: 2429-35.
- van der Woude, M. W. & D. A. Low** (1994): Leucine-responsive regulatory protein and deoxyadenosine methylase control the phase variation and expression of the *sfa* and *daa* pili operons in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **11**: 605-618.
- van der Woude, M. W., L. S. Kaltenbach & D. A. Low** (1995): Leucine-responsive regulatory protein plays dual roles as both an activator and a repressor of the *Escherichia coli pap* fimbrial operon. *Mol. Microbiol.* **17**: 303-12.
- van der Woude, M., W. B. Hale & D. A. Low** (1998): Formation of DNA methylation patterns: nonmethylated GATC sequences in *gut* and *pap* operons. *J. Bacteriol.* **180**: 5913-20.
- van Helvoort, J. M. L. M., J. Kool & C. L. Woldringh** (1996): Chloramphenicol causes fusion of separated nucleoids in *Escherichia coli* K-12 cells and filaments. *J. Bacteriol.* **178**: 4289-4293.
- van Ulsen, P., M. Hillebrand, L. Zulianello, P. van de Putte & N. Goosen** (1996): Integration host factor alleviates the H-NS-mediated repression of the early promoter of bacteriophage Mu. *Mol. Microbiol.* **21**: 567-78.
- Varshavsky, A. J., A. Nedospasov, V. V. Bakayeva, T. G. Bakayeva & G. Georgiev** (1977): Histone-like proteins in the purified *Escherichia coli* deoxyribonucleoprotein. *Nucl. Acids Res.* **4**: 2725-2745.
- Walker, G. C.** (1984): Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**: 60-93.
- Wang, J. C.** (1985): DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 665-697.
- Wang, Q. & J. M. Calvo** (1993): Lrp, a global regulatory protein of *E. coli*, binds cooperatively to multiple sites and activates transcription of *ilvIH*. *J. Mol. Biol.* **229**: 306-318.
- Wang, Q., J. C. Wu, D. Friedberg, J. Plakto & J. M. Calvo** (1994): Regulation of the *Escherichia coli lrp* gene. *J. Bacteriol.* **176**: 1831-1839.
- Waterman, S. R. & P. L. Small** (1996): Identification of sigma S-dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **21**: 925-40.
- Weigel, C., A. Schmidt, H. Seitz, D. Tungler, M. Welzeck & W. Messer** (1999): The N-terminus promotes oligomerization of the *Escherichia coli* initiator protein DnaA. *Mol. Microbiol.* **34**: 53-66.
- Weinreich, M. D. & W. S. Reznikoff** (1992): Fis plays a role in Tn5 and IS50 transposition. *J. Bacteriol.* **174**: 4530-4537.
- Werner, M. H., G. M. Clore, A. M. Gronenborn & H. A. Nash** (1994): Symmetry and asymmetry in the function of *Escherichia coli* integration host factor - implications for target identification by DNA-binding proteins. *Curr. Biology* **4**: 477-487.
- White, B. A.** (1993). PCR protocols, J. M. e. Walker, Humana Press, Totowa N.J.
- White-Ziegler, C. A., M. L. Angus Hill, B. A. Braaten, M. W. van der Woude & D. A. Low** (1998): Thermoregulation of *Escherichia coli pap* transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. *Mol. Microbiol.* **28**: 1121-37.

- Wild, J., A. Kamath-Loeb, E. Ziegelhoffer, M. Lonetto, Y. Kawasaki & C. A. Gross** (1992): Partial loss of function mutations in DnaK, the *Escherichia coli* homologue of the 70-kDa heat shock proteins, affect highly conserved amino acids implicated in ATP binding and hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7139-43.
- Williams, R. M., S. Rimsky & H. Buc** (1996): Probing the structure, function, and interactions of the *Escherichia coli* H-NS and StpA proteins by using dominant negative derivatives. *J. Bacteriol.* **178**: 4335-43.
- Williams, R. M. & S. Rimsky** (1997): Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein H-NS: a central controller of gene regulatory networks. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**: 175-185.
- Willins, D. A., C. W. Ryan, J. V. Platko & J. M. Calvo** (1991): Characterization of Lrp, an *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. *J. Biol. Chem.* **266**: 10768-10774.
- Woolfson, D. N. & D. H. Williams** (1990): The influence of proline residues on alpha-helical structure. *FEBS Lett.* **277**: 185-188.
- Worcel, A. & E. Burgi** (1972): On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **71**: 127-147.
- Wu, T. H. & M. G. Marinus** (1994): Dominant negative mutator mutations in the *mutS* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 5393-400.
- Xu, J. & R. C. Johnson** (1995): Fis activates the RpoS-dependent stationary-phase expression of *proP* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 5222-31.
- Yamada, H., S. Muramatsu & T. Mizuno** (1990): An *Escherichia coli* protein that preferentially binds to sharply curved DNA. *J. Biochem.* **108**: 420-425.
- Yamada, H., T. Yoshida, K. Tanaka, C. Sasakawa & T. Mizuno** (1991): Molecular analysis of the *Escherichia coli hns* gene encoding a DNA-binding protein, which preferentially recognizes curved DNA sequences. *Mol. Gen. Genet.* **230**: 332-6.
- Yamanaka, K., T. Ogura, H. Niki & S. Hiraga** (1995): Characterization of the *smtA* gene encoding an S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **133**: 59-63.
- Yamashino, T., M. Kakeda, C. Ueguchi & T. Mizuno** (1994): An analogue of the DnaJ molecular chaperone whose expression is controlled by a sigma(s) during the stationary phase and phosphate starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **13**: 475-483.
- Yamashino, T., C. Ueguchi & T. Mizuno** (1995): Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigma(S), in *Escherichia coli* - Involvement of the nucleoid protein H-NS. *EMBO J.* **14**: 594-602.
- Yang, C.-C. & A. A. Nash** (1989): The interaction of *E. coli* IHF protein with its specific binding sites. *Cell* **57**: 869-880.
- Yang, Y. & G. F.-L. Ames** (1990): The family of repetitive extragenic palindromic sequences: interaction with DNA gyrase and histone-like protein HU. In *Bacterial chromosome*, pp. 211-223, K. Drlica and M. Riley, eds., Am. Soc. Microbiol. Press, Washington, D.C.
- Yaron, A. & F. Naider** (1993): Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 31-81.
- Yasuzawa, K., N. Hayashi, N. Goshima, K. Kohno, F. Imamoto & Y. Kano** (1992): Histone-like proteins are required for cell growth and constraint of supercoils in DNA. *Gene* **122**: 9-15.
- Yim, H. H., R. L. Brems & M. Villarejo** (1994): Molecular characterization of the promoter of *osmY*, an *rpoS*-dependent gene. *J. Bacteriol.* **176**: 100-107.
- Yoshida, T., T. Yamashino, C. Ueguchi & T. Mizuno** (1993): Expression of the *Escherichia coli* dimorphic glutamic acid decarboxylases is regulated by the nucleoid protein H-NS. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 1568-1569.
- Yoshida, T., C. Ueguchi & T. Mizuno** (1993): Physical map location of a set of *Escherichia coli* genes (*hde*) whose expression is affected by the nucleoid protein H-NS. *J. Bacteriol.* **175**: 7747-7748.
- Yuan, H. S., S. E. Finkel, J. A. Feng, M. Kaczor-Grzeskowiak, R. C. Johnson & R. E. Dickerson** (1991): The molecular structure of wild-type and a mutant Fis protein: relationship between mutational changes and recombinational enhancer function or DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9559-9562.

- Zavacki, A. M., J. W. Harney, G. A. Brent & P. R. Larsen** (1993): Dominant negative inhibition by mutant thyroid hormone receptors is thyroid hormone response element and receptor isoform specific. *Mol. Endocrinol.* **7**: 1319-1330.
- Zhang, A. & M. Belfort** (1992): Nucleotide sequence of a newly-identified *Escherichia coli* gene, *stpA*, encoding an H-NS-like protein. *Nucl. Acids Res.* **20**: 6735.
- Zhang, A., V. Derbyshire, J. L. G. Salvo & M. Belfort** (1995): *Escherichia coli* protein StpA stimulates self-splicing by promoting RNA assembly *in vitro*. *RNA* **1**: 783-793.
- Zhang, A., S. Rimsky, M. E. Reaban, H. Buc & M. Belfort** (1996): *Escherichia coli* protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics. *EMBO J.* **15**: 1340-9.
- Zhang, X., T. Reeder & R. Schleif** (1996): Transcription activation parameters at *ara pBAD*. *J. Mol. Biol.* **258**: 14-24.
- Ziegler, B.** (1996): Die *fnr*-unabhängige Regulation der Fumaratreduktase in *Escherichia coli*. .
- Zientz, E., J. Bongaerts & G. Unden** (1998): Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (*dcuSR* genes) two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* **180**: 5421-5.
- Zimmerman, S. B.** (1993): Macromolecular crowding effects on macromolecular interactions: some implications for genome structure and function. *Biochem. Biophys. Acta* **1216**: 175-185.
- Zimmerman, S. B. & L. D. Murphy** (1996): Macromolecular crowding and the mandatory condensation of DNA in bacteria. *FEBS Lett.* **390**: 245-248.
- Zuber, F., D. Kotlarz, S. Rimsky & H. Buc** (1994): Modulated expression of promoters containing upstream curved DNA sequences by the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **12**: 231-240.
- Zusman, D. R., A. Carbonell & J. Y. Haga** (1973): Nucleoid condensation and cell division in *Escherichia coli* MX74T2 *ts52* after inhibition of protein synthesis. *J. Bacteriol.* **115**: 1167-1178.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich als erstes bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Erhard Bremer bedanken für das außerordentlich interessante Thema, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die Diskussionsbereitschaft.

Herr Prof. Dr. R. Thauer danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Dr. Uwe Völker möchte ich mich für die Hilfe bei der 2-D-Elektrophorese bedanken.

Antonio Pierrek danke ich für die Diskussionsbereitschaft bezüglich Protein technischer Fragen.

Meinen Laborkollegen, besonders Bettina Kempf, möchte für ihre Hilfestellungen und Gesprächsbereitschaft danken.

Bei meinem Sportquintett möchte ich mich bedanken für die gemeinsame Zeit beim sportlichen Ausgleich.

Meinen Eltern danke ich für die motivierende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Meinem Mainzer „Team“, daß sie mir in den drei Jahren den Rücken gestärkt haben und mir das Kontakt-halten leicht gemacht haben.

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfen benutzt habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch in keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg/Lahn 2000